



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C07K 14/54, C12P 21/02, C12N 15/24, A61K 38/20</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/12555</p> <p>(43) 国際公開日 2000年3月9日(09.03.00)</p>						
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/05186</p> <p>(22) 国際出願日 1998年11月18日(18.11.98)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <table border="0"> <tr> <td>特願平10/247588</td> <td>1998年9月1日(01.09.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平10/327914</td> <td>1998年11月18日(18.11.98)</td> <td>JP</td> </tr> </table> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 林原生物化学研究所 (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO)[JP/JP] 〒700-0907 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 Okayama, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 鳥越角二(TORIGOE, Kakuji)[JP/JP] 〒710-0133 岡山県倉敷市藤戸町藤戸1343番地の5 Okayama, (JP) 谷合まどか(TANIAI, Madoka)[JP/JP] 〒700-0802 岡山県岡山市三野2丁目12番44号 Okayama, (JP) 栗本雅司(KURIMOTO, Masashi)[JP/JP] 〒700-0011 岡山県岡山市学南町2丁目7番25号 Okayama, (JP)</p>		特願平10/247588	1998年9月1日(01.09.98)	JP	特願平10/327914	1998年11月18日(18.11.98)	JP	<p>(81) 指定国 BR, CA, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
特願平10/247588	1998年9月1日(01.09.98)	JP						
特願平10/327914	1998年11月18日(18.11.98)	JP						
<p>(54)Title: INTERLEUKIN 18-BINDING PROTEIN</p> <p>(54)発明の名称 インターロイキン-18結合蛋白質</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A protein containing a specific amino acid sequence which binds to IL-18 and thus regulates the physiological actions thereof; a DNA encoding this protein; and IL-18 regulators and drugs for sensitivity diseases containing the above IL-18-binding protein as the active ingredient.</p>								

## (57)要約

本発明は、IL-18に結合することによってその生理作用を抑制する物質とその用途、さらには、その物質をコードするDNAの提供を課題とし、特定のアミノ酸配列を含有するIL-18結合蛋白質と、その蛋白質をコードするDNAと、有効成分としてIL-18結合蛋白質を含有するIL-18抑制剤及び抗感受性疾患剤を提供することにより該解決するものである。

PCTに基づいて公開される国際出願のパフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア			TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明細書

## インターロイキン－１８結合蛋白質

## ５ 技術分野

この発明は新規なサイトカン結合蛋白質、とりわけ、インターロイキン－１８結合蛋白質に関する。

## 背景技術

- 10 インターロイキン－１８（以下、「ＩＬ－１８」と略記する。）は、免疫系における情報伝達物質であるサイトカインの１種である。特開平８－２７１８９号公報、特開平８－１９３０９８号公報及びハルキ・オカムラら『ネイチャー』、第３７８巻、第６，５５２号、８８乃至９１頁（１９９５年）に見られるように、ＩＬ－１８は、発見当初、「イン
- 15 ターフェロニン－γ誘導因子（ＩＧＩＦ）」と呼称されていたが、その後、シンペイ・ウシオら『ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー』、第１５６巻、４，２７４乃至４，２７９頁（１９９６年）における提案にしたがって、「ＩＬ－１８（インターロイキン－１８）」と呼称されるようになった。アンガス・ダブリュ・トムソン編『ザ・サイトカイン・ハン
- 20 ドブック』、第３版、アカデミック・プレス・リミテッド発行、４６５乃至４８９頁に記載されているように、成熟型のＩＬ－１８は１５７個のアミノ酸からなり、免疫担当細胞において生理活性物質として有用なインターフェロニン－γ（以下、「ＩＦＮ－γ」と略記する。）の産生を誘導する性質と、キラー細胞の細胞障害性を増強したり、キラー細胞そ
- 25 のものの生成を誘導する性質を兼備している。これらの性質ゆえに、ＩＬ－１８は抗ウイルス剤、抗菌剤、抗腫瘍剤、抗免疫疾患剤などの医薬

品として広範な用途が期待され、現在、その実用化を目指して鋭意研究が進められている。

前述のとおり、ＩＬ－１８にかぎらず、サイトカインは、本来、免疫系における情報伝達を担う物質として産生され、分泌される。したがって、ＩＬ－１８が哺乳類の体内で過剰に産生されたり、外部から過剰に投与されたりすると、免疫系のバランスに偏りを生じ、生体にとって有害な免疫反応を惹起する可能性がある。例えば、特開平１０－９６７３０号公報などにみられるように、最近の知見は、慢性関節リウマチを含む自己免疫疾患の患者が、ＩＬ－１８の体液レベルにおいて、健常者より有意に高いことを示している。このことは、ＩＬ－１８がある種の疾患の発症に直接又は間接に関与していることを物語っている。したがって、斯界においては、ＩＬ－１８そのものの生理作用の解明や実用化に加えて、ＩＬ－１８の生理作用を抑制する物質が一刻も早く解明され、実用化されることが期待されている。

斯かる状況に鑑み、この発明の第一の課題は、ＩＬ－１８の生理作用を抑制する性質を有し、医薬品としてヒトを含む哺乳類に適用可能な物質を提供することにある。

さらに、この発明の第二の課題は、斯かる物質をコードするＤＮＡを提供することにある。

加えて、この発明の第三の課題は、斯かる物質のＩＬ－１８抑制剤としての用途を提供することにある。

さらに加えて、この発明の第四の課題は、斯かる物質の医薬品としての用途を提供することにある。

## 25 発明の開示

本発明者がこれらの課題を解決すべく鋭意研究したところ、ＩＬ－１

8に結合することによってその生理作用を抑制する物質が哺乳類の体液中に存在することを突き止めた。本発明者がこの物質を分離し、性質・性状を調べたところ、その本質は蛋白質であり、単離された状態でもIL-18に結合し、その生理作用を顕著に抑制することを見出した。さらに、斯くして存在が確認されたIL-18結合蛋白質は、ヒトを含む哺乳類に投与すると、自己免疫疾患、炎症性疾患及びアレルギー疾患を含む、過剰な免疫反応に起因する諸種の疾患の治療・予防に効果を発揮することも見出した。

すなわち、この発明は、前記第一の課題を、配列表における配列番号1及び2に示すいずれかのアミノ酸配列の全部又は一部を含有するIL-18結合蛋白質を提供することにより解決するものである。

さらに、この発明は、前記第二の課題を、斯かるIL-18結合蛋白質をコードするDNAを提供することにより解決するものである。

加えて、この発明は、前記第三の課題を、有効成分として、斯かるIL-18結合蛋白質を含有するIL-18抑制剤を提供することにより解決するものである。

さらに加えて、この発明は、前記第四の課題を、有効成分として、斯かるIL-18結合蛋白質を含有する抗感受性疾患剤を提供することにより解決するものである。

20

#### 図面の簡単な説明

第1図は、ヒト由来のIL-18結合蛋白質のペプチドマップである。図において、クロマトグラムA及びクロマトグラムBは、それぞれ、トリプシン消化後及びトリプシン／ペプシン消化後に得られたペプチドマップである。図中、1乃至20は、それぞれ、アミノ酸配列を解析したペプチド断片1乃至20の溶出位置を示している。

25

第2図は、マウス由来のIL-18結合蛋白質のペプチドマップである。図において、クロマトグラムA及びクロマトグラムBは、それぞれ、トリプシン消化後及びトリプシン／ペプシン消化後に得られたペプチドマップである。図中、1乃至8は、それぞれ、アミノ酸配列を解析した

5 ペプチド断片1乃至8の溶出位置を示している。

第3図は、ヒト由来のIL-18結合蛋白質をコードする塩基配列を含む組換えDNAの構造を示す制限酵素地図である。

第4図は、マウス由来のIL-18結合蛋白質をコードする塩基配列を含む組換えDNAの構造を示す制限酵素地図である。

なお、図において、以下の符号は、それぞれ以下のものを表す。

5	EFH18BPH6 cDNA	ヒト由来のIL-18結合蛋白質をコードする塩基配列を含むcDNA
	EFM18BPH-MK2 cDNA	マウス由来のIL-18結合蛋白質をコードする塩基配列を含むcDNA
10	EF1 $\alpha$ P	延長因子1プロモーター
	Amp	アンピシリン耐性遺伝子
	ori	複製起点

#### 発明を実施する最良の形態

- 15 以下、この発明の実施の形態について説明すると、この発明の蛋白質は、IL-18に結合することによってその生理作用を抑制する性質と、独特のアミノ酸配列により特徴付けられる。すなわち、この発明のIL-18結合蛋白質は、IL-18に作用させると、IL-18の代表的な生理作用である、免疫担当細胞においてIFN- $\gamma$ の産生を誘導する
- 20 作用を抑制する。また、当該IL-18結合蛋白質は、IL-18に結合させると、IL-18の生理作用によるキラー細胞の細胞障害性の増強や、キラー細胞の生成の誘導を抑制する場合がある。この発明のIL-18結合蛋白質は配列表における配列番号1及び2に示すいずれかのアミノ酸配列の全部又は一部を含んでなり、例えば、ヒト由来のIL-
- 25 18結合蛋白質は、部分アミノ酸配列として、配列表における配列番号3乃至23に示すアミノ酸配列の全部又は一部を、また、マウス由来の

IL-18結合蛋白質は配列表における配列番号24乃至31に示すアミノ酸配列の全部又は一部をそれぞれ含有する。この発明のIL-18結合蛋白質は、尿や血液などの体液においては、通常、可溶性糖蛋白質として存在し、還元剤存在下のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下、「SDS-PAGE」と略記する。）を適用すると、分子量約40,000乃至60,000ダルトンにIL-18結合能を伴う蛋白質のバンドを示す。

この発明のIL-18結合蛋白質は、斯かる特徴を指標にして、哺乳類の体液や細胞から得ることができる。個々の体液としては、血液、リンパ液、腹腔内液、尿などが挙げられ、また、細胞としては、上皮細胞、内皮細胞、間質細胞、軟骨細胞、単球、顆粒球、リンパ球、神経細胞及びそれらを培養株化して得られる細胞株が挙げられる。経済性を問題にするのであれば、この発明のIL-18結合蛋白質をコードするDNAに組換えDNA技術を適用するのが有利である。この発明のIL-18結合蛋白質をコードするDNAは、配列番号1乃至31に示すアミノ酸配列に基づき哺乳類の遺伝子を検索することにより得ることができる。例えば、この発明のIL-18結合蛋白質をコードするヒト由来のDNAは、通常、配列表における配列番号32に示す塩基配列の全部又は一部を、また、マウス由来のDNAは、通常、配列表における配列番号33に示す塩基配列の全部又は一部をそれぞれ含有する。斯かるDNAにより形質転換した動物及び微生物由来の宿主は、常法にしたがって培養することにより、この発明のIL-18結合蛋白質を高収量で産生する。動物由来の宿主の具体例としては、例えば、3T3細胞（ATCC CCL-92）、C1271細胞（ATCC CRL-1616）、CHO-K1細胞（ATCC CCL-61）、CV-1細胞（ATCC CCL-70）、COS-1細胞（ATCC CRL-1650）、H



e L a細胞（A T C C C C L - 2）、M O P 8細胞（A T C C C R L - 1 7 0 9）及びそれらの変異株を始めとする、ヒト、サル、マウス及びハムスター由来の上皮系細胞、間質系細胞及び造血系細胞が挙げられる。微生物由来の宿主の具体例としては、例えば、細菌、真菌及び  
5 酵母が挙げられる。これらの宿主のうち、動物由来の宿主や酵母は、糖蛋白質としての形態の当該 I L - 1 8 結合蛋白質の産生にとりわけ有用である。

上記のごとき給源を用いてこの発明の I L - 1 8 結合蛋白質を調製するには、体液又は細胞若しくは微生物の培養物を、必要に応じて、超音  
10 波などにより破碎した後、生理活性蛋白質を精製するための慣用の方法、例えば、塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈澱、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電  
15 気泳動などを単独又は組合せて適用すればよい。

ところで、免疫系は、本来、有害な異物から生体を防御するためのものであるが、ときとして、その働きゆえに、却って、生体に有害な結果をもたらすことがある。哺乳類に、例えば、皮膚、腎臓、肝臓、心臓、骨髄などの臓器を移植すると、同種異系抗原に対する拒絶反応により、  
20 T細胞が活性化され、リンパ球が増殖したり、炎症が生じることがある。症状の程度こそ違え、同様の現象は、例えば、アレルゲンのように、宿主が固有のものと見做さない異種異系抗原が侵入した場合にも観察される。また、自己免疫疾患においては、本来、固有のものと見做されるべき成分がアレルギー反応を惹起する。

25 この発明の I L - 1 8 結合蛋白質は、免疫系を活性化する I L - 1 8 に結合することによってその生理作用を抑制する I L - 1 8 抑制剤とし

て機能するので、ヒトを含む哺乳類に投与すると、上記のごとき免疫反応を抑制することが期待される。したがって、この発明でいう感受性疾患とは、拒絶反応及びアレルギー反応を含む免疫反応一般の亢進に起因する免疫疾患を含み、この発明のIL-18結合蛋白質が直接又は間接

5 に作用して治療及び／又は予防し得るすべての疾患ということになる。

個々の感受性疾患としては、例えば、上記のごとき臓器移植に伴う拒絶反応に加えて、活動性慢性肝炎、萎縮性胃炎、自己免疫性溶血性貧血、バセドウ病、ベーチェット症候群、CRST症候群、寒冷凝集素性溶血性貧血、潰瘍性大腸炎、グッドパスチャー症候群、甲状腺機能亢進症、

10 慢性甲状腺炎、特発性血小板減少性紫斑病、若年性糖尿病、白血球減少症、多発性硬化症、重症筋無力症、発作性寒冷血色素尿症、悪性貧血、多発性結節性動脈炎、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、リウマチ熱、慢性関節リウマチ、橋本病、シェーグレン症候群、クローン病、交換性眼炎、進行性全身性硬化症、ウェジナー肉芽腫症、HIV感染症、喘息、

15 アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、花粉症及びハチ毒アレルギーを含む自己免疫疾患、炎症性疾患及びアレルギー性疾患一般が挙げられる。

なお、この発明のIL-18結合蛋白質は、IFN- $\gamma$ の過剰産生や過剰投与などに起因する敗血症ショックの治療・予防にも有効である。また、生体内において、IL-18がFasリガンドの産生を増強したり、

20 逆に、FasリガンドがIL-18の細胞からの分泌を誘導する場合があるので、この発明のIL-18結合蛋白質は、Fas及びFasリガンドが関与する免疫疾患一般の治療・予防にも有効である。さらに、この発明のIL-18結合蛋白質は、例えば、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎、中毒性肝炎、劇症肝炎、ウイルス性肝硬変、アルコール性肝硬変、中毒性肝硬変、胆汁性肝硬変、脂肪肝、肝臓腫瘍及び肝血管障害

25 などの肝疾患、胆管炎、胆嚢炎、原発性硬化性胆管炎、胆嚢腫瘍及び胆

管腫瘍などの胆嚢・胆道疾患、急性膵炎、慢性膵炎、膵機能不全、膵臓腫瘍及び膵嚢胞などの膵疾患の治療・予防、さらには、それらの疾患に伴う、例えば、食欲不振、倦怠感、疲労感、腹痛、背痛、黄疸、発熱、肝性脳症、腹水、出血傾向などの肝機能障害及び肝機能不全を緩和又は

5 解消する効果もある。その際、例えば、プロトポルフィリン、チオプリン、マロチラート、肝臓加水分解物、グリチルリチン、ジクロロ酢酸ジイソプロピルアミン、メチルメチオニンスルホニウムクロリド、グルタチオン、タウリン、シアニダノール、インターフェロン、ビタミンB<sub>1</sub>、ビタミンB<sub>2</sub>、ビタミンB<sub>6</sub>、ビタミンB<sub>12</sub>、チオクト酸、小紫胡湯、大

10 紫胡湯、紫胡桂枝湯、アスパラギン酸、甘草、メチオニン、チオプリン、グリチルリチンなどの肝細胞の機能を促進する薬剤を併用してもよい。

加えて、この発明のIL-18結合蛋白質は、虚血、虚血性心筋症、脳虚血、脳底動脈片頭痛、脳底部異常血管網症、脳卒中、脳底部動脈瘤、動脈硬、血管内皮障害、糖尿病、腸管膜血管閉塞症及び上腸管膜動脈症

15 候群を含む循環器系疾患、パーキンソン病、脊髄筋肉萎縮症、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、痴呆症、脳血管性痴呆症、エイズ痴呆症及び脳脊髄炎を含む神経系疾患の症状を緩和したり、予防する効果もある。斯くして、有効成分としてIL-18結合蛋白質を含有するこの

発明の抗感受性疾患剤は、ヒトをはじめとする哺乳動物における上記の

20 ごとき感受性疾患を治療・予防するための抗自己免疫疾患剤、抗炎症剤、抗アレルギー剤、抗腫瘍剤、免疫抑制剤、増血剤、白血球増多剤、血小板増多剤、鎮痛剤、解熱剤、肝機能改善剤などとして多種多様な用途を有することとなる。剤型並びに感受性疾患の種類及び症状にもよるが、

この発明の感受性疾患剤は、通常、液状、懸濁状、ペースト状又は固状

25 に調製され、この発明のIL-18結合蛋白質を0.00001乃至100% (w/w)、望ましくは、0.0001乃至20% (w/w) 含

んでなる。

この発明の抗感受性疾患剤は、 $IL-18$  結合蛋白質単独の形態はもとより、 $IL-18$  結合蛋白質とそれ以外の生理的に許容される、例えば、補助剤、増量剤、希釈剤、賦形剤、安定剤、防腐剤、免疫助成剤、  
5 着色剤、着香剤、さらには、必要に応じて、他の生理活性物質の1又は複数との組成物としての形態をも包含する。安定剤としては、例えば、血清アルブミンやゼラチンなどの蛋白質、グルコース、シュクロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、ソルビトール、マルチトール、マンニトール、ラクチトールなどの糖質及びクエン酸塩、燐酸塩若しくは  
10 は炭酸塩を主体とする緩衝剤が、また、併用し得る他の生理活性物質としては、例えば、アスピリン、フルフェナム酸、メフェナム酸、ジクロフェナック、インドメタシン、トルメチン、イブプロフェン、ケトプロフェン、フェニルブタゾン、オキシフェンブタゾン、消炎酵素剤、金製剤、クロロキン製剤などの抗炎症剤、FK506、シクロフォスファミ  
15 ド、アザチオプリン、メトトレキセート、サイクロスポリンA、副腎皮質ホルモンなどの免疫抑制剤、さらには、 $IL-18$  及び  $IL-18$  以外のサイトカインの受容体アンタゴニスト、例えば、インターロイキン-1 受容体蛋白質、インターロイキン-2 受容体蛋白質、インターロイキン-5 受容体蛋白質、インターロイキン-6 受容体蛋白質、インター  
20 ロイキン-8 受容体蛋白質、インターロイキン-12 受容体蛋白質及び  $IL-18$  受容体蛋白質に対する、ヒト化抗体を含むそれぞれの抗体や、 $TNF-\alpha$  受容体、 $TNF-\beta$  受容体、インターロイキン-1 受容体、インターロイキン-5 受容体、インターロイキン-8 受容体及び  $IL-18$  受容体に対するそれぞれのアンタゴニスト、さらには、インターロ  
25 イキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-5、インターロイキン-8、インターロイキン-6、インターロイキン-8、インタ

ーロイキン-12及びインターロイキン-18に対する、ヒト化抗体を含むそれぞれの抗体が挙げられる。

さらに、この発明の抗感受性疾患剤は、投薬単位形態の薬剤をも包含し、その投薬単位形態の薬剤とは、IL-18結合蛋白質を、例えば、  
5 1回当りの用量又はその整数倍（4倍まで）若しくはその約数（1/40まで）に相当する量を含んでなり、投薬に適する物理的に一体の剤型にある薬剤を意味する。このような投薬単位形態の薬剤としては、エキ  
ス剤、エリキシル剤、カプセル剤、顆粒剤、丸剤、眼軟膏剤、懸濁剤、  
乳剤、硬膏剤、坐剤、散剤、酒精剤、錠剤、シロップ剤、浸剤、煎剤、  
10 注射剤、補輸液、チンキ剤、点眼剤、トローチ剤、軟膏剤、パップ剤、  
芳香水剤、リニメント剤、リモナーデ剤、流エキス剤及びローション剤  
が挙げられ、必要に応じて、点鼻剤、鼻噴霧剤、下気道吸入剤、眼科用  
除法剤、口腔粘膜貼付剤及び浣腸剤としてもよい。この発明の抗感受性  
疾患剤は経口的に投与しても非経口的に投与してもよく、いずれの場合  
15 にも、感受性疾患の治療・予防に効果を発揮する。感受性疾患の種類や  
症状にもよるが、具体的には、患者の症状や投与後の経過を観察しなが  
ら、成人当り約1 $\mu$ g/回乃至1g/回、通常、約10 $\mu$ g/回乃至1  
00mg/回のIL-18結合蛋白質を1乃至4回/日又は1乃至5回  
/週の用量で1日乃至半年に亘って経口投与するか、あるいは、皮内、  
20 皮下、筋肉内又は静脈内に非経口投与すればよい。

ところで、この発明のIL-18結合蛋白質をコードするDNAは、  
いわゆる、「遺伝子療法」にも有用である。すなわち、通常の遺伝子療  
法においては、この発明のDNAを、例えば、レトロウイルス、アデノ  
ウイルス、アデノ随伴ウイルスなどのウイルス由来のベクターに挿入す  
25 るか、カチオニックポリマーや膜融合型リポソームなどのリポソームに  
包埋し、この状態でIL-18結合蛋白質に感受性を有する疾患に罹患

した患者に直接注入するか、あるいは、患者からリンパ球を採取し、生  
体外で導入した後、患者に自家移植するのである。斯くして、この発明  
のDNAは、例えば、自己免疫疾患やアレルギー性疾患などの免疫疾患  
や、肝機能障害及び神経系疾患を含む各種疾患の遺伝子療法、さらには、  
5 臓器移植に伴う拒絶反応や過剰な免疫反応の抑制に著効を発揮すること  
となる。なお、これらの遺伝子療法を実施するための一般的手順は、例  
えば、島田隆、斉藤泉、小澤敏也編集、『実験医学別冊バイオマニユア  
ルUPシリーズ 遺伝子治療の基礎技術』、1996年、羊土社発行に  
も詳述されている。

10 以下、実施例に沿ってこの発明の実施の形態を説明するが、斯界の技  
術水準においては、斯かる実施例は多種多様に改変可能である。斯かる  
技術水準に鑑み、この発明がこれらの実施例のみに限定されないことは  
言うまでもない。なお、この発明による蛋白質のIL-18結合能は、  
後記実施例においては、次の結合アッセイにより決定される阻害率を指  
15 標にして判定した。

すなわち、IL-18受容体をコードするDNAをチャイニーズハム  
スター卵巢由来のCHO-K1細胞(ATCC CRL-9618)に  
導入することによって、IL-18受容体が細胞表面に過剰に発現した  
効果細胞を調製する。別途、0.1% (w/v) アジ化ナトリウム、0.  
20 1% (v/v) ウシ血清アルブミン及び100mM N-2-ヒドロキ  
シエチルピペラジン-N-2-エタンスルホン酸をそれぞれ含むRP  
M1-1640培地(pH7.2)を調製し、これをアッセイ用培地と  
する。次いで、試験区として、アッセイ用培地により適宜希釈した被検  
試料を50 $\mu$ lとり、これにアッセイ用培地により適宜希釈した<sup>125</sup>I標  
25 識IL-18を50 $\mu$ l加え、4℃で1時間振盪した後、アッセイ用培  
地に細胞密度1 $\times$ 10<sup>7</sup>個/mlになるように浮遊させた効果細胞を50

5  $\mu$ l 加え、4℃でさらに1時間振盪する。その後、1.5ml 容遠心管  
 にジブチルフタレート/ジオクチルフタレート混液（容積比1：1）を  
 200  $\mu$ l とり、その上部に効果細胞の浮遊液を重層し、4℃で5分間  
 遠心分離し、吸引により上清を除去した後、細胞残渣を遠心管ごと切り  
 5 取り、ガンマカウンター（商品名『ARC-300型』、アロカ株式会  
 社製造）により放射能強度を測定する。併行して、 $^{125}$ I 標識 IL-18  
 とともに未標識 IL-18 を5  $\mu$ g 加える系（非特異的結合区）と、被  
 験試料のみ省略する系（総結合区）をそれぞれ設け、これらを試験区と  
 同様に処置する。そして、試験区、総結合区及び非特異的吸着区におい  
 10 て得られた放射能強度を下記の式にそれぞれ代入して阻害率（%）を計  
 算した。

総結合区    —    試験区

$$\text{阻害率（\%）} = \frac{\text{総結合区} - \text{試験区}}{\text{総結合区} - \text{非特異的結合区}} \times 100$$

総結合区    —    非特異的結合区

15

実施例1：ヒト由来の IL-18 結合蛋白質

＜実施例1-1：IL-18 結合蛋白質の調製＞

人尿3lを膜濃縮した後、20mM 燐酸緩衝液（pH7.0）に対し  
 て4℃で20時間透析した。透析内液を採取し、これをあらかじめ20  
 20 mM 燐酸緩衝液（pH7.0）により平衡化しておいたアフィニティー  
 クロマトグラフィー用ゲル（商品名『ウイト・ジャーム・レクチン・  
 セファロース6MB』、アマシャム・ファルマシア・バイオテク株式会  
 社販売）230mlのカラムに負荷してIL-18 結合蛋白質を吸着せ  
 しめ、カラムを20mM 燐酸緩衝液（pH7.0）により洗浄した後、  
 25 0.5M N-アセチル-D-グルコサミンを含有する20mM 燐酸緩  
 衝液（pH7.0）を通液しつつ、カラムからの溶出液を一定量ずつ採

取した。

各溶出画分の I L - 1 8 結合能を前記結合アッセイにより調べた後、  
I L - 1 8 結合能が認められた画分を合一し、20 mM 燐酸緩衝液 (p  
H 7. 0) に対して 4℃ で 16 時間透析した。透析内液を採取し、適宜  
5 濃縮した後、あらかじめ 20 mM 燐酸緩衝液 (p H 7. 0) により平衡  
化しておいたイオン交換クロマトグラフィー用ゲル (商品名『T S K -  
g e l D E A E - 5 P W』、東ソー株式会社製造) 54 m l のカラム  
に負荷し、塩化ナトリウムの濃度が 100 分間で 0 M から 0. 5 M まで  
直線的に上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下にて 20 mM 燐酸緩衝液  
10 (p H 7. 0) を 2 m l / 分の流速で通液し、塩化ナトリウム濃度が 0.  
2 M 付近で溶出した画分を採取した。

この画分を膜濃縮した後、あらかじめ 20 mM 燐酸 - 食塩緩衝液 (以  
下、「P B S」という。) により平衡化しておいたゲル濾過クロマトグ  
ラフィー用ゲル (商品名『H i L o a d S u p e r d e x 200』、  
15 アマシャム・ファルマシア・バイオテク株式会社販売) 120 m l のカ  
ラムに負荷し、カラムに P B S を通液しつつ、ゲル濾過クロマトグラフ  
ィーにおける分子量が 70, 000 ダルトン付近の画分を採取した。こ  
の新たに得られた画分をあらかじめ 0. 1 % (v / v) トリフルオロ酢  
酸水溶液により平衡化しておいた逆相クロマトグラフィー用ゲル (商品  
20 名『V y d a c 214 T P 54』、サイプレス・インターナショナル  
株式会社販売) 4 m l に負荷し、アセトニトリル濃度が 0 % (v / v)  
から 90 % (v / v) まで直線的に上昇するアセトニトリルの濃度勾配  
下にてカラムに 0. 1 % (v / v) トリフルオロ酢酸水溶液を通液しつ  
つ、カラムからの溶出液を一定量ずつ分画した。各溶出画分の I L - 1  
25 8 結合能を前記結合アッセイにより調べた後、I L - 1 8 結合能が確認  
された、アセトニトリル濃度が 70 % (v / v) 付近で溶出した画分を



採取し、濃縮したところ、ヒト由来の精製 IL-18 結合蛋白質が約 3  $\mu$ g 得られた。

その後、この精製 IL-18 結合蛋白質につき、ジチオトレイトール存在下の SDS-PAGE により分子量を測定したところ、約 40, 000 乃至 60, 000 ダルトンに IL-18 結合能を伴う蛋白質の単一バンドが観察された。また、大麦胚芽レクチンをリガンドとする『ウィート・ジャーム・レクチン・セファロース 6MB』に吸着することは、本例の IL-18 結合蛋白質が糖蛋白質であることを示している。

#### 10 <実施例 1-2: N 末端アミノ酸配列>

実施例 1-1 の方法により得た精製 IL-18 結合蛋白質を遠心濃縮機により乾固した後、8M 尿素及び 10mM EDTA をそれぞれ含有する 0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.1) に溶解し、窒素気流下、50℃ で 30 分間処理した。次いで、ジチオトレイトールを適量加え、窒素気流下、50℃ で 2 時間還元した後、反応物にモノヨード酢酸を適量加え、室温下、暗所にて 30 分間反応させて IL-18 結合蛋白質をアルキル化した。

得られたアルキル化物にジチオトレイトール存在下の SDS-PAGE を適用することによって分子量約 40, 000 乃至 60, 000 ダルトンに相当する蛋白質を分離し、以後、常法にしたがって、分離した IL-18 結合蛋白質のバンドを PVDF 膜へ転写後、その膜をプロテインシーケンサー (商品名『473A 型』、アプライド・バイオシステムズ社製造) を用いるアミノ酸分析に供して N 末端アミノ酸配列を決定した。その結果、実施例 1-1 の方法により得たこの発明の IL-18 結合蛋白質は、N 末端アミノ酸配列として、配列表における配列番号 3 に示すアミノ酸配列を含有していることが判明した (なお、「Xaa」は

未同定のアミノ酸であることを意味している)。

#### <実施例 1-3: ペプチドマッピング>

ウルフ・ヘルマンら『アナリティカル・バイオケミストリー』、第2  
5 24巻、451乃至455頁(1995年)に記載された『イン・ゲル  
・ダイジェスション法』により、実施例 1-2の方法により還元アルキ  
ル化した IL-18 結合蛋白質のトリプシン消化後及びトリプシン/ペ  
プシン消化後のペプチドマップをそれぞれ作成するとともに、トリプシ  
ン消化により得られたペプチド断片 1 乃至 8 及びトリプシン/ペプシン  
10 消化により得られたペプチド断片 9 乃至 20 のアミノ酸配列をそれぞれ  
決定した。その結果、ペプチド断片 1 乃至 20 は、それぞれ、配列表に  
おける配列番号 4 乃至 23 に示すアミノ酸配列を有していることが判明  
した(なお、「X a a」は未同定のアミノ酸であることを意味してい  
る)。このとき得られたペプチドマップを第 1 図に示す。

15

#### <実施例 1-4: IL-18 抑制作用>

免疫担当細胞及び IL-18 として、それぞれ、健常者のリンパ球及  
び組換え型ヒト IL-18 を、また、IFN- $\gamma$  の標準品として米国国  
立衛生研究所から入手した標準ヒト IFN- $\gamma$  (G g 02-901-5  
20 30) をそれぞれ用いた以外は、後記実施例 3-3 におけると同様に試  
験した。

その結果、本例の IL-18 結合蛋白質が共存すると、ヒト IL-1  
8 による IFN- $\gamma$  産生の誘導が有意に抑制された。このことは、本例  
の IL-18 結合蛋白質が IL-18 の生理作用を抑制することを示し  
25 ている。

実施例 2：ヒト由来の IL-18 結合蛋白質をコードする DNA

＜実施例 2-1：ヒト由来の IL-18 結合蛋白質をコードする DNA＞

＜実施例 2-1 (a)：ヒト由来の IL-18 結合蛋白質をコードする DNA の塩基配列＞

5

ポリ (A) 付加ヒト肝臓 RNA (クローンテック製) 10 ng に 10 × PCR 緩衝液 2 μl、25 mM 塩化マグネシウム 2 μl、0.1 M ジチオトレイトール 2 μl、25 mM dNTP ミックス 1 μl、200 単位/μl 逆転写酵素 (商品名『スーパースクリプト II』、ライフテック・オリエンタル株式会社製造) 1 μl 及び 2.5 μM ランダムヘキサマー 1 μl をそれぞれ加え、滅菌蒸留水で全量を 20 μl とした。この混合物を 0.5 ml 容反応管にとり、42℃で 50 分間、70℃で 15 分間、この順序で、それぞれインキュベートすることによって逆転写酵素反応させ、第一ストランド cDNA を含む反応物を得た。

10

15 この反応物に体積比で 2.5 倍量のエタノールと 3 M 酢酸ナトリウム 2 μl をそれぞれ加え、-20℃で 2 時間静置して cDNA を沈澱させた。沈澱を採取し、75% (v/v) 水性エタノールにより洗浄した後、滅菌蒸留水に溶解し、2.5 単位/μl DNA ポリメラーゼ (商品名『クロード Pfu ポリメラーゼ』、ストラタジーン製造) 0.5 μl、  
20 専用緩衝液 10 μl 及び 25 mM dNTP ミックス 1 μl をそれぞれ加え、さらに、センスプライマーとして、配列表における配列番号 3 に示すアミノ酸配列に基づき化学合成した 5'-ACNCCNGTNWSNCA-3' で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドと、アンチセンスプライマーとして、配列表における配列番号 8 に示すアミノ酸配列  
25 に基づき化学合成した 5'-TGNGCNARNACNACRTG-3' で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドをそれぞれ 10 μM 加え、

滅菌蒸留水で全量を100 $\mu$ lとした。この混合物を94 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C及び72 $^{\circ}$ Cで、この順序で、それぞれ1分間インキュベートするサイクルを40回繰返してPCR反応させた。

次いで、PCR産物の一部をとり、常法にしたがって、1% (w/v) アガロースゲル上で電気泳動することによってDNA断片を分画し、  
5      ナイロン膜に転写し、0.4N水酸化ナトリウムにより固定し、2 $\times$ SSCにより洗浄し、風乾した後、6 $\times$ SSPE、5 $\times$ デンハルト液、0.5% (w/v) SDS及び100 $\mu$ g/ml変性サケ精子DNAをそれぞれ含有するプレハイブリダイゼーション液に浸漬し、65 $^{\circ}$ Cで3時間  
10      インキュベートした。別途、常法にしたがって、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列に基づき5'-GGRCANGGRTCTT-3'で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドを化学合成し、これを[ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP及びT4ポリヌクレオチドキナーゼにより同位体  
15      標識することによってプローブを調製した。前記ナイロン膜を浸漬したプレハイブリダイゼーション液にこのプローブを1pmol加え、ナイロン膜を40 $^{\circ}$ Cでさらに20時間インキュベートしてハイブリダイズさせた。その後、6 $\times$ SSCによりナイロン膜を洗浄し、常法にしたがってオートラジオグラフィした。その結果、プローブの特異的なハイブリダイゼーションを示すシグナルが認められ、上記PCR産物が目的とするDNA断片を含むことが確認された。  
20

その後、残りのPCR産物にプラスミドベクター（商品名『pCR-Script Cam SK (+)』、ストラタジーン社製造）を1ng加え、DNAライゲーション・キット（商品名『DNAライゲーション・キット/バージョン2』、宝酒造株式会社製造）を用いてプラスミドベクター内にPCR産物であるDNA断片を挿入した。反応物の一部  
25      をとり、大腸菌株（商品名『XL1-Blue MRF<sup>r</sup> Kan<sup>r</sup>』、ス

トラタジーン社製造)を形質転換した後、形質転換体をクロラムフェニ  
コール $30\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB培地(pH7.5)に接種し、 $37^{\circ}\text{C}$   
で18時間培養し、培養物から菌体を採取し、これを常法にしたがって  
処理してプラスミドDNAを採取した。ジデオキシ法により調べたところ、このプラスミドDNAは、PCR産物のDNA断片の塩基配列として、配列表における配列番号34に示す塩基配列を含んでいた。その塩基配列がコードする、配列表における配列番号34に併記したアミノ酸配列と、配列表における配列番号3乃至23に示す、実施例1-2乃至1-3で決定した部分アミノ酸配列とを照合したところ、これらの部分  
5 アミノ酸配列は、いずれもその全部又は一部が配列番号34に併記したアミノ酸配列に含まれていた。このことは、配列表における配列番号34に示す塩基配列が、ヒト由来の当該IL-18結合蛋白質の少なくとも一部分をコードするものであることを示唆している。

15 <実施例2-1(b):ヒト由来のIL-18結合蛋白質をコードする  
DNAの塩基配列>

ポリ(A)付加ヒト肝臓RNA(クローンテック製) $10\text{ng}$ を、市販の5' RACEキット(商品名『5' RACEシステム、バージョン2.0』、ギブコ・ビー・アール・エル製)を用いて、PCRの一変法  
20 である5' RACEに供した。すなわち、先ず、上記RNAを、配列表における配列番号34に示す塩基配列に基づき化学合成した5'-GGTCACTTCCAATGCTGGACA-3'で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる逆転写酵素反応に供し、引き続きターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼ  
25 を作用させて、生成した第一ストランドcDNAの5'末端にCテイルを付加した。この第一ストランドcDNAを、次に、センスプライマー

として、上記キットに添付の5'-GGCCACGCGTCGACTA  
GTACGGG||GGG||GGG||G-3'で表される塩基配列  
のオリゴヌクレオチドと、アンチセンスプライマーとして、配列表にお  
ける配列番号34に示す塩基配列に基づき化学合成した5'-GTCC  
5 TTTGTGCTTCTAACTGA-3'を用いてPCR反応させ  
た。以上の5' RACEで得られた反応産物を一部とり、常法にしたがい1% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供したところ、特定のDNA  
断片の増幅が確認された。実施例2-1(a)におけると同様にして  
塩基配列を調べたところ、このDNA断片は、配列表における配列番号  
10 35に示す塩基配列を含有していた。この塩基配列における第160乃  
至216番目の塩基からなる配列は、実施例2-1(a)で決定した、  
配列表の配列番号34に示す塩基配列における第1乃至57番目の塩基  
からなる配列と完全に一致した。このことは、配列表における配列番号  
35に示す塩基配列が、配列番号34に示す、ヒト由来の当該IL-1  
15 8結合蛋白質の少なくとも一部をコードする塩基配列とオーバーラップ  
し、かつ、その5'末端側上流域に相当する塩基配列を含んでいること  
を示唆している。

＜実施例2-1(c)：ヒト由来のIL-18結合蛋白質をコードする  
20 DNAの塩基配列＞

ポリ(A)付加ヒト肝臓RNA(クローンテック製)10ngを、斎  
藤隆監訳、『PCR実験マニュアル』、HBJ出版発行(1991年)、  
25 乃至33に記載の方法にしたがって、PCRの一変法である3' R  
ACEに供した。すなわち、先ず、上記RNAを、5'-GACTCG  
25 AGTCGACATCGA(T)<sub>17</sub>-3'で表される塩基配列のヌクレ  
オチドをプライマーとして用いる逆転写酵素反応に供し、得られた第一

ストランド cDNA を、実施例 2-1 (a) で決定した、配列表における配列番号 34 に示す塩基配列に基づき化学合成した 5'-TTCTCCTGTGTGCTCTCGTGG-3' で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドをセンスプライマーとして、5'-GACTCGAGTCGACAATCG-3' で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドをアンチセンスプライマーとして用いて PCR 反応させた。以上の 3' RACE で得られた反応産物を一部とり、常法にしたがい 1% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供したところ、特定の DNA 断片の増幅が確認された。実施例 2-1 (a) におけると同様にして塩基配列を調べたところ、  
10 この DNA 断片は、配列表における配列番号 36 に示す塩基配列を含有していた。この塩基配列における第 1 乃至 60 番目の塩基からなる配列は、実施例 2-1 (a) で決定した、配列表の配列番号 34 に示す塩基配列における第 352 乃至 411 番目の塩基からなる配列と完全に一致した。このことは、配列表における配列番号 36 に示す塩基配列が、配  
15 列番号 34 に示す、ヒト由来の当該 IL-18 結合蛋白質の少なくとも一部をコードする塩基配列とオーバーラップし、かつ、その 3' 末端側下流域に相当する塩基配列を含んでいることを示唆している。

以上を示したように、実施例 2-1 (a) 乃至 2-1 (c) で、ヒト由来の当該 IL-18 結合蛋白質をコードする、互いにオーバーラップ  
20 する塩基配列として、配列表における配列番号 34 乃至 36 に示す塩基配列を決定した。互いにオーバーラップする部分の塩基配列を勘案すると、これらの塩基配列は、配列表における配列番号 37 に示す一連の塩基配列に由来する部分配列と考えられた。

25 <実施例 2-1 (d) : ヒト由来の IL-18 結合蛋白質をコードする DNA の塩基配列>

実施例 2-1 (a) の方法にしたがって、ポリ (A) 付加ヒト肝臓 R  
N A を逆転写酵素反応させた後、センスプライマーとして、配列表にお  
ける配列番号 37 に示す塩基配列に基づき化学合成した 5'-T G T G  
T G A C T G G A G A A G A G G A C-3' で表される塩基配列のオリ  
5 ゴヌクレオチドを、また、アンチセンスプライマーとして、配列表にお  
ける配列番号 37 に示す塩基配列に基づき化学合成した 5'-T A C A  
G G C A G T C A G G G A C T G T T C A C T C C A G-3' で表され  
る塩基配列のオリゴヌクレオチドをそれぞれ用いたこと以外は、実施例  
2-1 (b) におけると同様にして P C R 反応させた。この P C R 産物  
10 の一部をとり、常法にしたがい 1 % (w/v) アガロースゲル電気泳動  
に供したところ、特定の D N A 断片の増幅が確認された。引き続き、実  
施例 2-1 (a) におけると同様にして塩基配列を調べたところ、この  
D N A 断片は、配列表における配列番号 37 に示す塩基配列を有してい  
た。これにより、実施例 2-1 (a) 乃至 2-1 (c) で決定した、配  
15 列表における配列番号 34 乃至 36 に示す塩基配列が、配列番号 37 に  
示す一連の塩基配列の、それぞれ部分配列であることが裏付けられた。

一方、配列表における配列番号 37 に示す塩基配列によりコードされ  
る、そこに併記したアミノ酸配列と、配列表における配列番号 4 乃至 2  
3 に示す、実施例 1-3 で決定した部分アミノ酸配列とを照合したとこ  
20 ろ、これらの部分アミノ酸配列は、すべて配列番号 37 に併記したアミ  
ノ酸配列における第 1 乃至 164 番目のアミノ酸からなる部分に含まれ  
ていた。また、配列表における配列番号 3 に示す、実施例 1-2 で決定  
した N 末端アミノ酸配列は、配列表における配列番号 37 に併記したア  
ミノ酸配列における第 1 乃至 22 番目のアミノ酸からなる配列とよく一  
25 致した。したがって、以上のことは、配列表の配列番号 37 に示す塩基  
配列における第 160 乃至 651 番目の塩基からなる配列がヒト由来の



当該 IL-18 結合蛋白質をコードし得るものであり、そして、当該 IL-18 結合蛋白質が、全体としては、斯かる塩基配列に併記した第 1 乃至 164 番目のアミノ酸からなる配列を有する場合があることを示唆している。なお、以上のごとく示唆された、ヒト由来の当該 IL-18 結合蛋白質のアミノ酸配列とそれをコードする塩基配列は、配列表における配列番号 1 及び 32 にそれぞれ別記している。

＜実施例 2-2：形質転換体によるヒト由来の IL-18 結合蛋白質の  
産生＞

10 ＜実施例 2-2（a）：組換え DNA の調製＞

0.5 ml 反応管に、実施例 2-1（d）の方法で得た、ヒト由来の当該 IL-18 結合蛋白質をコードし得る DNA を 1 ng とり、これに、10  $\mu$ l の 10 $\times$ PCR 緩衝液、1  $\mu$ l の 25 mM dNTP ミックス及び 2.5 単位/ $\mu$ l DNA ポリメラーゼ（商品名『クローンド Pfu  
15  $\alpha$  ポリメラーゼ』、ストラタジーン製造）を加え、センスプライマーとして、配列表における配列番号 32 に示す塩基配列に基づき化学合成した 5'-CTCGAGGCCACCATGACCATGAGACACAAC-3' で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドを、また、アンチセンスプライマーとして、配列表における配列番号 32 に示す塩基配列  
20 に基づき化学合成した 5'-GCGGCCGCTCATTAGTGATGGTGATGGTGATGACCCCTGCTGCTGTGGACT-3' で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドをそれぞれ適量加えて、滅菌蒸留水で全量を 100  $\mu$ l とした。この混合物を、94℃で 1 分間、42℃で 2 分間及び 72℃で 3 分間インキュベートするサイクルを 3 回  
25 繰返した後、さらに 94℃で 1 分間、60℃で 2 分間及び 72℃で 3 分間インキュベートするサイクルを 35 回繰返して PCR 反応させた。

実施例 2-1 (a) におけると同様にして PCR 産物中に目的とする DNA 断片が存在することを確認する一方、実施例 2-1 (a) におけると同様にして当該 DNA 断片を挿入してなるプラスミドベクターを採取した。引き続き実施例 2-1 (a) におけると同様にして塩基配列を調べ、このプラスミド DNA が、配列表における配列番号 32 に示す塩基配列を含むことを確認した。

常法にしたがって、上記で得たプラスミド DNA に制限酵素 Xho I 及び Not I を作用させて得た DNA 断片 100 ng に、エス・ミズシマら、『ニュークレイック・アシッド・リサーチ』、第 17 号、第 18 巻、5、332 頁 (1990 年) に記載された方法に準じて調製し、予め制限酵素 Xho I 及び Not I で切断しておいたプラスミドベクター『pEF-BOS』を 10 ng 加え、DNA ライゲーション・キット (商品名『DNA ライゲーション・キット/バージョン 2』、宝酒造株式会社製造) を用いてプラスミドベクター内に DNA 断片を挿入した。

15 実施例 2-1 (a) におけると同様にして、ライゲーション反応産物で、大腸菌株を形質転換し、得られた形質転換体から組換え DNA を採取し、この組換え DNA を『pEFH18BPH6』と命名した。常法にしたがって分析したところ、第 3 図に示すように、組換え DNA『pEFH18BPH6』においては、ヒト由来の当該 IL-18 結合蛋白質をコードし得る、配列表における配列番号 32 に示す塩基配列を含有する cDNA『EFH18BPH6 cDNA』が、延長因子 1 プロモーター『EF1 $\alpha$ P』の下流に連結されていた。

20

<実施例 2-2 (b) : 形質転換体によるヒト由来の IL-18 結合蛋白質の産生>

25

実施例 2-2 (a) で得た、組換え DNA『pEFH18BPH6』

を含む形質転換大腸菌株を、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$  アンピシリンを含む LB 培地 (pH 7.2) に接種し、 $37^\circ\text{C}$  で 18 時間通気攪拌培養した後、培養物から常法にしたがいプラスミド DNA を採取して、組換え DNA 『pEFH18BPH6』を得た。この組換え DNA を  $20\mu\text{g}$  とり、

5 予め常法にしたがい増殖させておいた、 $1\times 10^7$  個のアフリカミドリザルの腎臓由来の繊維芽細胞株 COS-1 細胞 (ATCC CRL-1650) に、エレクトロポレーション法により導入して、この発明の DNA が導入された形質転換体を得た。

平底培養瓶に培地 (商品名『ASF104』、味の素製) をとり、こ

10 れに、上記で得た形質転換体を  $1\times 10^5$  個/ $\text{ml}$  の割合で接種し、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター中、 $37^\circ\text{C}$  で 3 日間培養した。培養物から培養上清を採取し、アフィニティークロマトグラフィー用ゲル (商品名『Ni-NTA』、キアジェン製) のカラムに負荷した。このカラムに、 $20\text{mM}$  イミダゾールを含む PBS を通液して非吸着画分を除去した後、

15  $50\text{mM}$  イミダゾールを含む PBS を通液し、カラムからの溶出液を一定量ずつ分画採取した。それぞれの画分における IL-18 結合蛋白質の有無を前記結合アッセイにより調べ、当該蛋白質の存在の確認された画分を採取し、合一して、 $1\times 10^7$  個の当該形質転換体より、約  $2\text{ml}$  の精製 IL-18 結合蛋白質の水溶液を得た。この水溶液の蛋白質含量

20 は約  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。この水溶液を、実施例 1-2 の方法にしたがって処理し、N 末端アミノ酸配列を分析したところ、配列表における配列番号 3 と同一のアミノ酸配列が得られた。なお、対照として、組換え DNA 『pEFH18BPH6』に代えてプラスミドベクター 『pEF-BOS』を用いて、本実施例と同様に処置したところ、IL-18 結合蛋白質の存在は確認されなかった。以上の結果は、ヒト由来の当該 IL-18 結合蛋白質が配列表における配列番号 1 に示すアミノ酸配

25

列を有する場合があります、そして、当該蛋白質が、配列番号32に示す塩基配列によりコードされ得ることを裏付けている。

### 実施例3：マウス由来のIL-18結合蛋白質

#### 5 <実施例3-1：IL-18結合蛋白質の調製>

コリネバクテリウム・パルバム(ATCC11827)を60℃で1時間加熱して得た死菌体を8週齢の雌CD-1マウス600匹の腹腔内に1mg/匹の割合で注射投与し、通常の方法で7日間飼育した後、静脈内に大腸菌由来の精製リポ多糖を1μg/匹の割合で注射投与した。

- 10 2時間後、マウスの心臓から血液を採取し、これを常法にしたがって処理して血清200mlを得た。その後、この血清を実施例1-1の方法により精製したところ、マウス由来の精製IL-18結合蛋白質が約3μg得られた。

- その後、この精製IL-18結合蛋白質につき、ジチオトレイトール  
15 存在下のSDS-PAGEにより分子量を測定したところ、約40,000乃至60,000ダルトンにIL-18結合能を伴う蛋白質の単一バンドが観察された。なお、大麦胚芽レクチンをリガンドとする『ウィート・ジャーム・レクチン・セファロース6MB』に吸着することは、本例のIL-18結合蛋白質が糖蛋白質であることを示している。

20

#### <実施例3-2：ペプチドマッピング>

- 実施例3-1の方法により得た精製IL-18結合蛋白質につき、実施例1-3におけると同様にしてペプチドマップを作成するとともに、トリプシン消化により得られたペプチド断片1乃至5及びトリプシン/  
25 ペプシン消化により得られたペプチド断片6乃至8のアミノ酸配列を調べたところ、ペプチド断片1乃至8は、それぞれ、配列表における配列

番号24乃至31に示すアミノ酸配列を有していた（なお、「Xaa」は未同定のアミノ酸であることを意味している）。このとき得られたペプチドマップを第2図に示す。

5    <実施例3-3：IL-18抑制作用>

14週齢の雌C3H/HeJマウスから脾臓を摘出し、分散し、付着細胞を除去した後、脾細胞を10%（v/v）ウシ胎児血清を補足したRPMI-1640培地（pH7.4）に細胞密度 $1 \times 10^7$ 個/mlになるように浮遊させ、免疫担当細胞とした。次いで、脾細胞及び2.5  
10  $\mu\text{g/ml}$ コンカナバリンAをマイクロプレートにそれぞれ0.15ml/ウェル及び0.05mlずつ分注し、組換え型マウスIL-18を25ng/mlと、IL-18に対して過剰量の、実施例3-1の方法により得た精製IL-18結合蛋白質とを含む新鮮な同一培地を0.05ml/ウェル加えた後、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37℃で24  
15 時間培養した。培養後、各ウェルから培養上清を0.1mlずつ採取し、産生したIFN- $\gamma$ を通常の酵素免疫法により測定した。併行して、IL-18結合蛋白質及びマウスIL-18のいずれかを省略した系をそれぞれ設け、これを上記と同様に処置して対照とした。なお、IFN- $\gamma$ の標準品には、米国国立衛生研究所から入手した標準マウスIFN- $\gamma$ （G802-901-533）を用い、国際単位（IU）に換算して  
20 表示した。

その結果、IL-18結合蛋白質を省略した対照におけるIFN- $\gamma$ の産生量が約600IU/mlであり、また、マウスIL-18を省略した対照におけるIFN- $\gamma$ の産生量が0IU/mlであったのに対して、IL-18結合蛋白質を加えた系においては、僅かに60IU/ml  
25 前後であった。このことは、本例のIL-18結合蛋白質がIL-1

8の生理作用を抑制することを示している。

実施例4：マウス由来のIL-18結合蛋白質をコードするDNA

5 <実施例4-1：マウス由来のIL-18結合蛋白質をコードするDNA>

<実施例4-1(a)：マウス由来のIL-18結合蛋白質をコードするDNAの塩基配列>

10 コリネバクテリウム・パルバム(ATCC 11827)を60℃で1時間加熱し、得られた死菌体を8週齢の雌CD-1マウスの腹腔内に1mg/匹の割合で注射投与した。7日間飼育した後、静脈内に大腸菌由来の精製リポ多糖を1μg/匹の割合で注射投与し、2時間後、頸椎を脱臼させて屠殺し、肝臓を摘出した。摘出した肝臓を湿重で3gとり、これを6Mグアニジンイソチオシアナート、10mMクエン酸ナトリウム及び0.5%(w/v)SDSからなる混液(pH7.0)20ml

15 に浸漬し、ホモゲナイザーにより破碎した。次いで、35ml容遠心管に5.7M塩化セシウムを含有する0.1MEDTA(pH7.5)を25mlずつ注入し、その上部に細胞破碎物を10mlずつ重層し、この状態で20℃、25,000rpmで20時間超遠心分離した。その後、RNA画分を採取し、これを15ml容遠心管にとり、等量のクロロホルム/イソブタノール混液(体積比4:1)を加え、5分間振盪し、4℃、10,000rpmでさらに10分間遠心分離した後、水層部を採取した。採取した水層に2.5倍容のエタノールを加え、-20℃で2時間静置することによって全RNAを沈澱させた後、沈澱を採取し、75%(v/v)水性エタノールで洗浄し、滅菌蒸留水0.5ml

25 に溶解した。

以後、この全RNAを実施例2-1(a)におけると同様にして逆転

写酵素反応させ、得られた第一ストランド cDNA を含む反応物を、センスプライマーとして、配列表における配列番号 27 に示すアミノ酸配列に基づき化学合成した 5' - G C N G T N C C N A C N A A - 3' で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドを、また、アンチセンスプライマーとして、配列表における配列番号 30 に示すアミノ酸配列に基づき化学合成した 5' - G T Y T T N A R N C C R T C - 3' で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドをそれぞれ用いた以外は実施例 2-1 (a) におけると同様にして PCR 反応させた。その後、プローブの調製に、配列表における配列番号 24 に示すアミノ酸配列に基づき化学合成した 5' - S W N G T R T G N C C Y T C Y T T - 3' で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドを用いた以外は、実施例 2 におけると同様にして PCR 産物中に目的とする DNA 断片が存在することを確認する一方、実施例 2-1 (a) におけると同様にして当該 DNA 断片の塩基配列を調べたところ、当該 DNA 断片は配列表における配列番号 38 に示す塩基配列を有していた。配列表における配列番号 38 に併記したアミノ酸配列と、配列表における配列番号 24 乃至 31 に示す、実施例 3-2 で決定した部分アミノ酸配列とを照合したところ、これらの部分アミノ酸配列は、いずれもその全部又は一部が配列番号 38 に併記したアミノ酸配列に含まれていた。このことは、配列表における配列番号 38 に示す塩基配列が、マウス由来の当該 IL-18 結合蛋白質の少なくとも一部分をコードするものであることを示唆している。

＜実施例 4-1 (b) : マウス由来の IL-18 結合蛋白質をコードする DNA の塩基配列＞

25 実施例 4-1 (a) の方法にしたがって、コリネバクテリウム・パルバムの死菌体とリポ多糖で処理した雌性 CD-1 マウスより採取した全

RNA 1  $\mu$ g を、市販の 5' RACE キット（商品名『5' RACE システム、バージョン 2.0』、ギブコ・ビー・アール・エル製）を用いて、PCR の一変法である 5' RACE に供した。すなわち、先ず、上記全 RNA を、配列表における配列番号 38 に示す塩基配列に基づき化学合成した 5'-TGCA GGCAGTACAGGACAAGG-3' で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる逆転写酵素反応に供し、引き続いてターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼを作用させて、生成した第一ストランド cDNA の 5' 末端に C テイルを付加した。この第一ストランド cDNA を、次に、センスプライマーとして、上記キットに添付の 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGG||GGG||GGG||G-3' で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドと、アンチセンスプライマーとして、配列表における配列番号 38 に示す塩基配列に基づき化学合成した 5'-GTGCTGGGTACTGCTTAGTTG-3' とを用いて PCR 反応させた。以上の 5' RACE で得られた反応産物を一部とり、常法にしたがい 1% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供したところ、特定の DNA 断片の増幅が確認された。実施例 2-1 (a) におけると同様にして塩基配列を調べたところ、この DNA 断片は、配列表における配列番号 39 に示す塩基配列を含有していた。この塩基配列における第 307 乃至 336 番目の塩基からなる配列は、実施例 4-1 (a) で決定した、配列表の配列番号 38 に示す塩基配列における第 1 乃至 30 番目の塩基からなる配列と完全に一致した。このことは、配列表における配列番号 39 に示す塩基配列が、配列番号 38 に示す、マウス由来の当該 IL-18 結合蛋白質の少なくとも一部をコードする塩基配列とオーバーラップし、かつ、その 5' 末端側上流域に相当する塩基配列を含んでいることを示唆している。



＜実施例 4-1 (c) : マウス由来の IL-18 結合蛋白質をコードする DNA の塩基配列＞

実施例 4-1 (a) の方法にしたがって、コリネバクテリウム・パル  
5 バムの死菌体とリポ多糖で処理した雌性 CD-1 マウスより採取した全  
RNA 1  $\mu$ g を、斎藤隆監訳、『PCR 実験マニュアル』、HBJ 出版  
発行 (1991 年)、25 乃至 33 に記載の方法にしたがって、PCR  
の一変法である 3' RACE に供した。すなわち、先ず、上記 RNA を、  
5'-GACTCGAGTCGACATCGA (T)<sub>17</sub>-3' で表され  
10 る塩基配列のヌクレオチドをプライマーとして用いる逆転写酵素反応に  
供し、得られた第一ストランド cDNA を、実施例 4-1 (a) で決定  
した、配列表における配列番号 38 に示す塩基配列に基づき化学合成し  
た 5'-GATCCTGGACAAGTGGCC-3' で表される塩基  
配列のオリゴヌクレオチドをセンスプライマーとして、5'-GACT  
15 CGAGTCGACATCG-3' で表される塩基配列のオリゴヌクレ  
オチドをアンチセンスプライマーとして用いて PCR 反応させた。以上  
の 3' RACE で得られた反応産物を一部とり、常法にしたがい 1%  
(w/v) アガロースゲル電気泳動に供したところ、特異的な DNA 断  
片の増幅が確認された。実施例 2-1 (a) におけると同様にして塩基  
20 配列を調べたところ、この DNA 断片は、配列表における配列番号 40  
に示す塩基配列を含有していた。この塩基配列における第 1 乃至 63 番  
目の塩基からなる配列は、実施例 4-1 (a) で決定した、配列表の配  
列番号 38 に示す塩基配列における第 289 乃至 351 番目の塩基から  
なる配列と完全に一致した。このことは、配列表における配列番号 40  
25 に示す塩基配列が、配列番号 38 に示す、マウス由来の当該 IL-18  
結合蛋白質の少なくとも一部をコードする塩基配列とオーバーラップし、

かつ、その3'末端側下流域に相当する塩基配列を含んでいることを示唆している。

5 以上に示したように、実施例4-1(a)乃至4-1(c)で、マウス由来の当該IL-18結合蛋白質をコードする、互いにオーバーラップする塩基配列として、配列表における配列番号38乃至40に示す塩基配列を決定した。互いにオーバーラップする部分の塩基配列を勘案すると、これらの塩基配列は、配列表における配列番号41に示す一連の塩基配列に由来する部分配列と考えられた。

10 <実施例4-1(d)：マウス由来のIL-18結合蛋白質をコードするDNAの塩基配列>

実施例4-1(a)の方法にしたがって、コリネバクテリウム・パルバムの死菌体とリポ多糖で処理した雌性CD-1マウスより採取した全RNAを逆転写酵素反応させた後、センスプライマーとして、配列表に  
15 おける配列番号41に示す塩基配列に基づき化学合成した5'-CTGAGCCTTAGAGCTCCAAG-3'で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドを、また、アンチセンスプライマーとして、配列表における配列番号41に示す塩基配列に基づき化学合成した5'-GTGAAGCTTGAGTTTGAGGTTTC-3'で表される塩基配列のオリ  
20 リゴヌクレオチドをそれぞれ用いたこと以外は、実施例4-1(c)におけると同様にしてPCR反応させた。このPCR産物の一部をとり、常法にしたがい1%(w/v)アガロースゲル電気泳動に供したところ、特異的なDNA断片の増幅が確認された。引き続き、実施例2-1(a)におけると同様にして塩基配列を調べたところ、このDNA断片は、配  
25 列表における配列番号41に示す塩基配列を有していた。これにより、実施例4-1(a)乃至4-1(c)で決定した、配列表における配列

番号 38 乃至 40 に示す塩基配列が、配列番号 41 に示す一連の塩基配列の、それぞれ部分配列であることが裏付けられた。

一方、配列表における配列番号 41 に示す塩基配列によりコードされる、そこに併記したアミノ酸配列と、配列表における配列番号 24 乃至 31 に示す、実施例 3-2 で決定した部分アミノ酸配列とを照合したところ、これらの部分アミノ酸配列は、すべて配列番号 41 に併記したアミノ酸配列における第 1 乃至 165 番目のアミノ酸からなる部分に含まれていた。また、配列表における配列番号 1 に示す、ヒト由来の当該 IL-18 結合蛋白質のアミノ酸配列は、配列表における配列番号 41 に併記したアミノ酸配列における第 1 乃至 165 番目のアミノ酸からなる配列と約 61% の相同性を示した。したがって、以上のことは、配列表の配列番号 41 に示す塩基配列における第 235 乃至 729 番目の塩基からなる配列がマウス由来の当該 IL-18 結合蛋白質をコードし得るものであり、そして、当該 IL-18 結合蛋白質が、全体としては、斯かる塩基配列に併記した第 1 乃至 165 番目のアミノ酸からなる配列を有する場合があることを示唆している。なお、以上のごとく示唆された、マウス由来の当該 IL-18 結合蛋白質のアミノ酸配列とそれをコードする塩基配列は、配列表における配列番号 2 及び 33 にそれぞれ別記している。

20

＜実施例 4-2：形質転換体によるマウス由来の IL-18 結合蛋白質の産生＞

＜実施例 4-2 (a)：組換え DNA の調製＞

0.5 ml 反応管に、実施例 4-1 (d) の方法で得た、マウス由来の当該 IL-18 結合蛋白質をコードし得る DNA を 1 ng とり、これを、配列表における配列番号 33 に示す塩基配列に基づき化学合成した

25

5´-CTCGACGCCACCATGACCATGAGACACTG  
C-3´で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドをセンスプライマー  
として、また、配列表における配列番号33に示す塩基配列に基づき化  
学合成した5´-GCGGCCGCTCATTTAGTGATGGTGA  
5 TGGTGATGTGCAACCCCTGGGCGCTGC-3´で表さ  
れる塩基配列のオリゴヌクレオチドをアンチセンスプライマーとして用  
いたこと以外は実施例2-2(a)におけると同様に処置してPCR反  
応させた。実施例4-1(a)におけると同様にしてPCR産物中に目  
的とするDNA断片が存在することを確認する一方、当該DNA断片を  
10 挿入してなるプラスミドベクターを採取した。引き続き実施例2-1  
(a)におけると同様にして塩基配列を調べ、このプラスミドDNAが、  
配列表における配列番号33に示す塩基配列を含むことを確認した。

上記で得たプラスミドDNAを、実施例2-2(a)におけると同様  
にしてプラスミドベクター『pEF-BOS』に挿入して組換えDNA  
15 とし、得られた組換えDNAを『pEFM18BPH-MK2』と命名  
した。常法にしたがって分析したところ、第4図に示すように、組換え  
DNA『pEFM18BPH-MK2』においては、マウス由来の当該  
IL-18結合蛋白質をコードし得る、配列表における配列番号33に  
示す塩基配列を含有するcDNA『EFM18BPH-MK2 cDN  
20 A』が、延長因子1プロモーター『EF1 $\alpha$ P』の下流に連結されてい  
た。

＜実施例4-2(b)：形質転換体によるマウス由来のIL-18結合  
蛋白質の産生＞

25 実施例4-2(a)で得た組換えDNA『pEFM18BPH-MK  
2』を含む形質転換大腸菌株の培養物より、常法にしたがいプラスミド

DNAを採取して、組換えDNA『pEFM18BPH-MK2』を得た。この組換えDNAを20 $\mu$ gとり、実施例2-2(b)におけると同様にしてCOS-1細胞(ATCC CRL-1650)に導入して、この発明のDNAが導入された形質転換体を得た。

- 5       引き続き実施例2-2(b)におけると同様にして、上記で得た形質転換体を培養し、培養物から培養上清を採取し、アフィニティークロマトグラフィー用ゲル(商品名『Ni-NTA』、キアジェン製)のカラムを用いてこの培養上清を分画し、IL-18結合蛋白質の存在が確認された画分を採取・合一し、 $1 \times 10^7$ 個の上記形質転換体より約2ml
- 10       の、精製IL-18結合蛋白質を含む水溶液を得た。この水溶液の蛋白質含量は約1 $\mu$ g/mlであった。この水溶液を、実施例1-2の方法にしたがって処理し、N末端アミノ酸配列を分析したところ、配列表における配列番号2におけるN末端部分のものと同一のアミノ酸配列が得られた。なお、対照として、組換えDNA『pEFH18BPH6』に
- 15       代えてプラスミドベクター『pEF-BOS』を用いて、本実施例と同様に処置したところ、IL-18結合蛋白質の存在は確認されなかった。以上の結果は、マウス由来の当該IL-18結合蛋白質が配列表における配列番号2に示すアミノ酸配列を有する場合があります、そして、当該蛋白質が、配列番号33に示す塩基配列によりコードされ得ることを裏付
- 20       けている。

以下、この発明のIL-18結合蛋白質を有効成分として含有する感受性疾患剤の実施例を具体的に説明する。

#### 実施例5：液剤

- 25       安定剤としてパイロジェン除去した結晶性トレハロース粉末(商品名『トレハオース』、株式会社林原商事販売)を1%(w/v)含む生理

食塩水に実施例 1 - 1 又は実施例 2 - 2 の方法により得た精製 I L - 1  
8 結合蛋白質を 1 m g / m l になるように溶解した後、常法にしたがっ  
て除菌して、2 種類の液剤を得た。

安定性に優れた本品は、いずれも、自己免疫疾患、炎症性疾患及びア  
5 レルギー性疾患を含む感受性疾患を治療・予防するための注射剤、点眼  
剤、点鼻剤などとして有用である。

#### 実施例 6：乾燥注射剤

安定剤としてパイロジェン除去したシュクロースを 1 % (w / v) 含  
10 む生理食塩水 1 0 0 m l に実施例 1 - 1 又は実施例 2 - 2 の方法により  
得た精製 I L - 1 8 結合蛋白質を 1 0 0 m g 溶解し、それぞれ、常法に  
したがって除菌した後、バイアル瓶に 1 m l ずつ分注し、凍結乾燥し、  
密栓した。

安定性に優れた本品は、いずれも、自己免疫疾患、炎症性疾患及びア  
15 レルギー性疾患を含む感受性疾患を治療・予防するための乾燥注射剤と  
して有用である。

#### 実施例 7：軟膏剤

滅菌蒸留水にカルボキシビニルポリマー（商品名『ハイビスワコー』、  
20 和光純薬工業株式会社製造）及びパイロジェンを除去した結晶性トレハ  
ロース粉末（商品名『トレハオース』、株式会社林原商事販売）をそれ  
ぞれ濃度 1 . 4 % (w / w) 及び 2 . 0 % (w / w) になるように溶解  
し、実施例 1 - 1 又は実施例 2 - 2 の方法により得た精製 I L - 1 8 結  
合蛋白質を均一に混合した後、p H 7 . 2 に調整して、1 g 当り I L -  
25 1 8 結合蛋白質を約 1 m g 含む 2 種類のペースト状物を得た。

延展性と安定性に優れた本品は、いずれも、自己免疫疾患、炎症性疾

患及びアレルギー性疾患を含む感受性疾患を治療・予防するための軟膏剤として有用である。

#### 実施例 8：錠剤

- 5      パイロジェンを除去した無水結晶  $\alpha$ -マルトース粉末（商品名『ファイントース』、株式会社林原商事販売）に実施例 1-1 又は実施例 2-2 の方法により得た精製 IL-18 結合蛋白質及び細胞賦活剤としてのルミンを均一に混合し、得られた混合物を常法にしたがって打錠して、製品 1 錠（約 200 mg）当り IL-18 結合蛋白質及びルミン（日本  
10      感光色素株式会社製）をそれぞれ約 1 mg 含む 2 種類の錠剤を得た。

摂取性、安定性に優れ、細胞賦活作用も兼備する本品は、いずれも、自己免疫疾患、炎症性疾患及びアレルギー性疾患を含む感受性疾患を治療・予防するための錠剤として有用である。

#### 15      実験：急性毒性試験

- 常法にしたがって、5 週齢の dd y マウス（体重 20 乃至 25 g）に実施例 1-1、2-2、3-1 及び 4-2 の方法により得た精製 IL-18 結合蛋白質を経口投与するか、腹腔内又は静脈内に注射投与した。その結果、これらの精製 IL-18 結合蛋白質の LD50 は、いずれの  
20      投与経路によっても、約 1 mg / マウス 1 匹体重以上であった。ことことは、この発明の IL-18 結合蛋白質がヒトを含む哺乳類に投与する医薬品に配合して安全であることを物語っている。

#### 産業上の利用可能性

- 25      以上説明したとおり、この発明は IL-18 に結合する新規な蛋白質の発見に基づくものである。この発明の蛋白質は、ヒトを含む哺乳類に

において、免疫系を活性化する I L - 1 8 の生理作用を抑制する性質を有するので、臓器移植に伴う拒絶反応の緩和や、過剰な免疫反応に起因する種々の疾患の治療・予防に著効を発揮する。

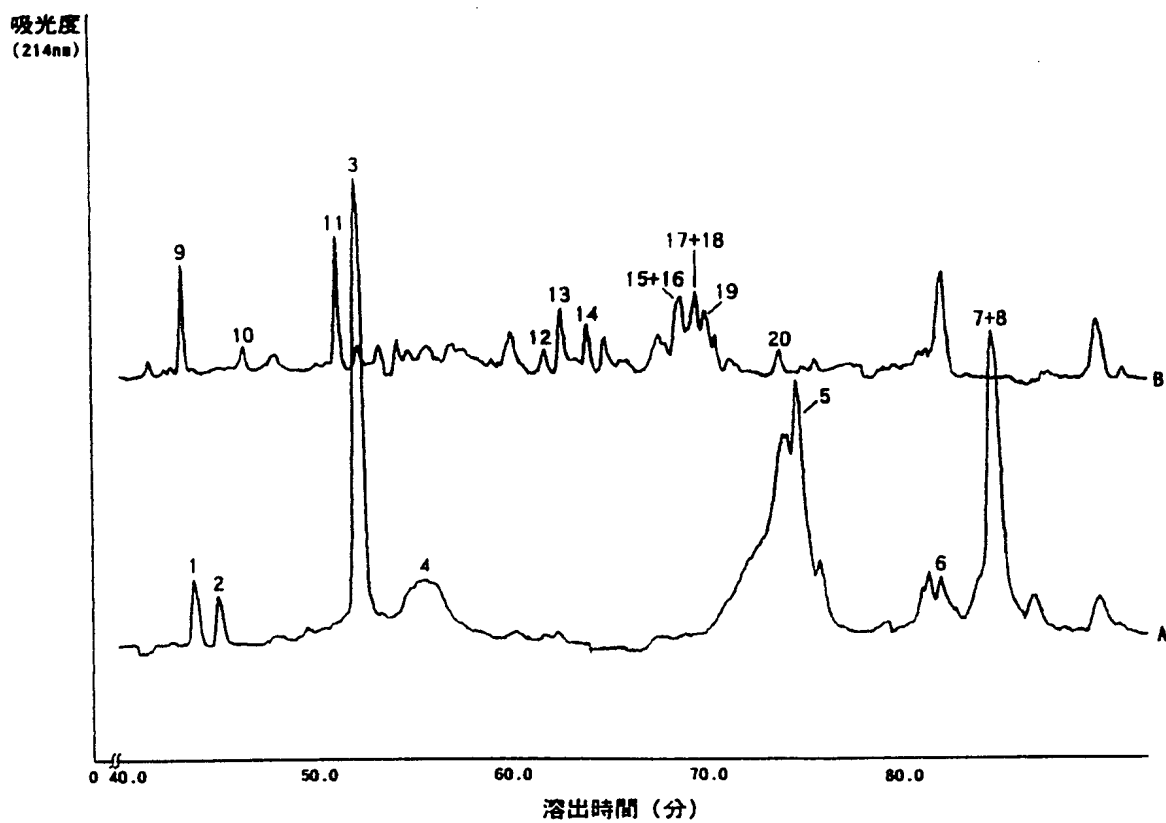


## 請求の範囲

1. 配列表における配列番号 1 及び 2 に示すいずれかのアミノ酸配列の全部又は一部を含有するインターロイキン-18 結合蛋白質。
2. 部分アミノ酸配列として、配列表における配列番号 3 乃至 31 に示すいずれかのアミノ酸配列の全部又は一部を含有する請求の範囲第 1 項に記載のインターロイキン-18 結合蛋白質。
3. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定すると、約 40,000 乃至 60,000 ダルトンの分子量を示す請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載のインターロイキン-18 結合蛋白質。
4. 哺乳類の体液から得ることのできる請求の範囲第 1 項、第 2 項又は第 3 項に記載のインターロイキン-18 結合蛋白質。
5. 請求の範囲第 1 項乃至第 4 項に記載のインターロイキン-18 結合蛋白質をコードする DNA。
6. 配列表における配列番号 32 又は 33 に示すいずれかの塩基配列若しくはその塩基配列に相同的な塩基配列又はそれらの塩基配列に相補的な塩基配列を含有する請求の範囲第 5 項に記載の DNA。
7. 有効成分として、請求の範囲第 1 項乃至第 4 項に記載のインターロイキン-18 結合蛋白質を含有するインターロイキン-18 抑制剤。
8. 有効成分として、請求の範囲第 1 項乃至第 4 項に記載のインターロイキン-18 結合蛋白質を含有する抗感受性疾患剤。
9. 抗免疫疾患剤としての請求の範囲第 8 項に記載の抗感受性疾患剤。

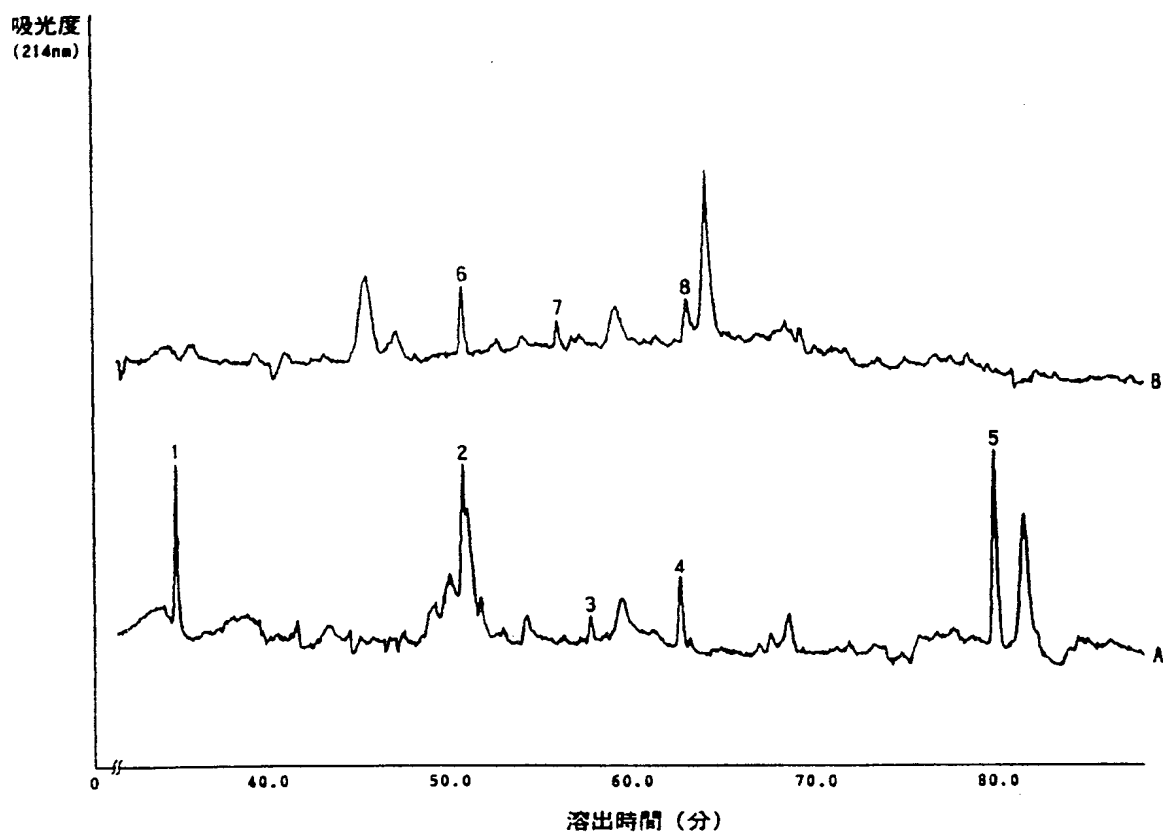
1/3

第 1 図



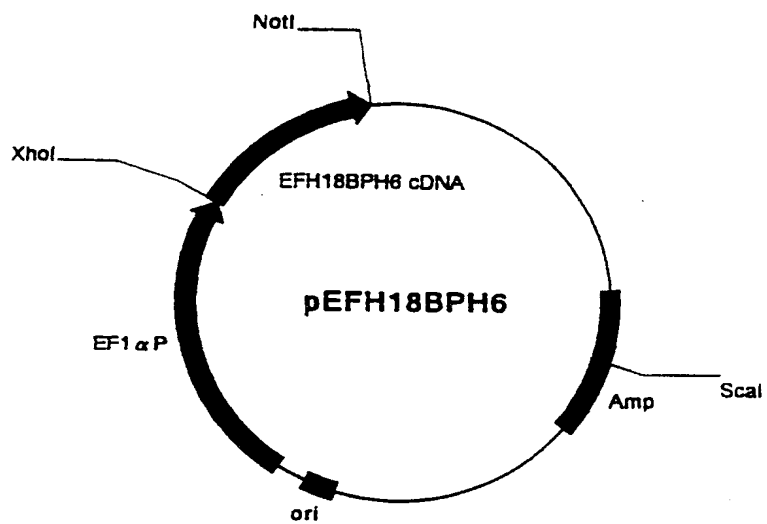
2/3

第2図

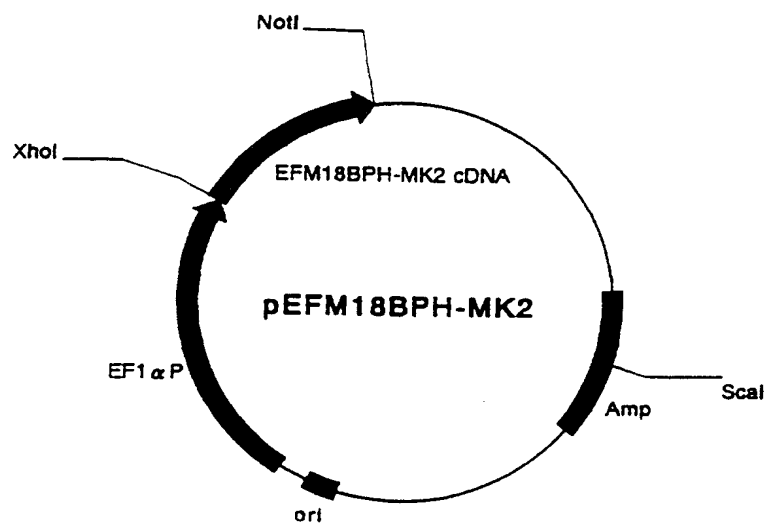


3/3

第 3 図



第 4 図



## SEQUENCE LISTING

<110> Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo

<120> Interleukin-18-binding protein

<140> PCT/JP98/05186

<141> 1998-11-18

<150> JP 247,588/98

<151> 1998-09-01

<150> JP 327,914/98

<151> 1998-11-18

<160> 41

<210> 1

<211> 164

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Thr	Pro	Val	Ser	Gln	Thr	Thr	Thr	Ala	Ala	Thr	Ala	Ser	Val	Arg	Ser
1				5				10					15		
Thr	Lys	Asp	Pro	Cys	Pro	Ser	Gln	Pro	Pro	Val	Phe	Pro	Ala	Ala	Lys
			20				25					30			
Gln	Cys	Pro	Ala	Leu	Glu	Val	Thr	Trp	Pro	Glu	Val	Glu	Val	Pro	Leu
			35				40					45			
Asn	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Cys	Ser	Arg	Phe	Pro	Asn
			50				55					60			
Phe	Ser	Ile	Leu	Tyr	Trp	Leu	Gly	Asn	Gly	Ser	Phe	Ile	Glu	His	Leu
			65				70					75			80
Pro	Gly	Arg	Leu	Trp	Glu	Gly	Ser	Thr	Ser	Arg	Glu	Arg	Gly	Ser	Thr
			85							90				95	
Gly	Thr	Gln	Leu	Cys	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Glu	Gln	Leu	Thr	Pro	Ala

100 105 110  
 Leu His Ser Thr Asn Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val  
 115 120 125  
 Val Gln Arg His Val Val Leu Ala Gln Leu Trp Ala Gly Leu Arg Ala  
 130 135 140  
 Thr Leu Pro Pro Thr Gln Glu Ala Leu Pro Ser Ser His Ser Ser Pro  
 145 150 155 160  
 Gln Gln Gln Gly

<210> 2

<211> 165

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Thr Ser Ala Pro Gln Thr Thr Ala Thr Val Leu Thr Gly Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Asp Pro Cys Ser Ser Trp Ser Pro Ala Val Pro Thr Lys Gln Tyr Pro  
 20 25 30  
 Ala Leu Asp Val Ile Trp Pro Glu Lys Glu Val Pro Leu Asn Gly Thr  
 35 40 45  
 Leu Thr Leu Ser Cys Thr Ala Cys Ser Arg Phe Pro Tyr Phe Ser Ile  
 50 55 60  
 Leu Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu Pro Gly Arg  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Glu Gly His Thr Ser Arg Glu His Arg Asn Thr Ser Thr Trp  
 85 90 95  
 Leu His Arg Ala Leu Val Leu Glu Glu Leu Ser Pro Thr Leu Arg Ser  
 100 105 110  
 Thr Asn Phe Ser Cys Leu Phe Val Asp Pro Gly Gln Val Ala Gln Tyr  
 115 120 125  
 His Ile Ile Leu Ala Gln Leu Trp Asp Gly Leu Lys Thr Ala Pro Ser  
 130 135 140  
 Pro Ser Gln Glu Thr Leu Ser Ser His Ser Pro Val Ser Arg Ser Ala  
 145 150 155 160  
 Gly Pro Gly Val Ala

165

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; UNSURE

&lt;222&gt; 6..8

&lt;223&gt; "Xaa" means an unidentified amino acid.

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; UNSURE

&lt;222&gt; 11

&lt;223&gt; "Xaa" means an unidentified amino acid.

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; UNSURE

&lt;222&gt; 13

&lt;223&gt; "Xaa" means an unidentified amino acid.

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; UNSURE

&lt;222&gt; 16..17

&lt;223&gt; "Xaa" means an unidentified amino acid.

&lt;400&gt; 3

Thr Pro Val Ser Gln Xaa Xaa Xaa Ala Ala Xaa Ala Xaa Val Arg Xaa

1

5

10

15

Xaa Lys Asp Pro Cys Pro

20

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Gly Ser Thr Gly Thr Gln Leu Cys Lys

1 5

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Glu Arg Gly Ser Thr Gly Thr Gln Leu Cys Lys

1 5 10

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Leu Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg

1 5

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> UNSURE

<222> 6..8

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<220>

<221> UNSURE



<222> 11

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<220>

<221> UNSURE

<222> 13

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<400> 7

Thr Pro Val Ser Gln Xaa Xaa Xaa Ala Ala Xaa Ala Xaa Val Arg

1

5

10

15

<210> 8

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> UNSURE

<222> 14

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<220>

<221> UNSURE

<222> 17..18

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<400> 8

His Val Val Leu Ala Gln Leu Trp Ala Gly Leu Arg Ala Xaa Leu Pro

1

5

10

15

Xaa Xaa Gln Glu Ala Leu Pro

20

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> UNSURE

<222> 8..9

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<400> 9

Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Xaa Xaa Ala

1 5 10

<210> 10

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> UNSURE

<222> 13..15

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<220>

<221> UNSURE

<222> 17..18

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<400> 10

Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Thr Pro Ala Leu His Xaa Xaa Xaa Phe

1 5 10 15

Xaa Xaa Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val Val Gln Arg

20 25

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> UNSURE

<222> 5

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<220>

<221> UNSURE

<222> 10

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<400> 11

Gln Cys Pro Ala Xaa Glu Val Thr Trp Xaa Glu Val

1 5 10

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg

1 5

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Leu Val Asp Pro Glu Gln

1 5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ile Glu His Leu Pro Gly Arg

1 5

<210> 15

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

His Val Val Leu

1

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Glu Gln Leu Thr Pro Ala Leu

1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Ile Glu His Leu Pro Gly Arg Leu

1 5

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> UNSURE

<222> 2

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<220>

<221> UNSURE

<222> 5

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<400> 18

Tyr Xaa Leu Gly Xaa Gly

1

5

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Phe Pro Asn Phe

1

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> UNSURE

<222> 2

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<220>

<221> UNSURE

<222> 5

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<220>

<221> UNSURE

<222> 7

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<400> 20

Tyr Xaa Leu Gly Xaa Gly Xaa Phe

1 5

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> UNSURE

<222> 4..5

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<400> 21

Glu Val Thr Xaa Xaa Glu Val

1 5

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> UNSURE

<222> 2

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<220>

<221> UNSURE

<222> 5

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<220>

<221> UNSURE

<222> 7

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<400> 22

Tyr Xaa Leu Gly Xaa Gly Xaa Phe

1

5

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> UNSURE

<222> 1..2

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<220>

<221> UNSURE

<222> 5..6

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<400> 23

Xaa Xaa Val Ala Xaa Xaa Arg Phe Pro Asn Phe

1

5

10

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Leu Lys Glu Gly His Thr Ser Arg

1 5

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> UNSURE

<222> 4

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<400> 25

Glu His Arg Xaa Thr Ser Thr Trp Leu His Arg

1 5 10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> UNSURE

<222> 4

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<220>

<221> UNSURE

<222> 8

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.



<400> 26

Glu His Arg Xaa Thr Ser Thr Xaa Leu His

1 5 10

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> UNSURE

<222> 1..8

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<400> 27

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Val Pro Thr Lys

1 5 10

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

Ala Leu Val Leu Glu Glu Leu Ser Pro Thr Leu Arg

1 5 10

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 29

Ile Glu His Leu Pro Gly Arg

1 5

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> UNSURE

<222> 1

<223> "Xaa" means an unidentified amino acid.

<400> 30

Xaa Asp Gly Leu Lys Thr

1

5

<210> 31

<211> 4

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

His Ile Ile Leu

1

<210> 32

<211> 492

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> mat peptide

<222> 1..492

<400> 32

aca cct gtc tcg cag acc acc aca gct gcc act gcc tca gtt aga agc 48

Thr Pro Val Ser Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser

1

5

10

15

aca aag gac ccc tgc ccc tcc cag ccc cca gtg ttc cca gca gct aag	96
Thr Lys Asp Pro Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys	
20 25 30	
cag tgt cca gca ttg gaa gtg acc tgg cca gag gtg gaa gtg cca ctg	144
Gln Cys Pro Ala Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu	
35 40 45	
aat gga acg ctg agc tta tcc tgt gtg gcc tgc agc cgc ttc ccc aac	192
Asn Gly Thr Leu Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe Pro Asn	
50 55 60	
ttc agc atc ctc tac tgg ctg ggc aat ggt tcc ttc att gag cac ctc	240
Phe Ser Ile Leu Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu	
65 70 75 80	
cca ggc cga ctg tgg gag ggg agc acc agc cgg gaa cgt ggg agc aca	288
Pro Gly Arg Leu Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser Thr	
85 90 95	
ggt acg cag ctg tgc aag gcc ttg gtg ctg gag cag ctg acc cct gcc	336
Gly Thr Gln Leu Cys Lys Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Thr Pro Ala	
100 105 110	
ctg cac agc acc aac ttc tcc tgt gtg ctc gtg gac cct gaa cag gtt	384
Leu His Ser Thr Asn Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val	
115 120 125	
gtc cag cgt cac gtc gtc ctg gcc cag ctc tgg gct ggg ctg agg gca	432
Val Gln Arg His Val Val Leu Ala Gln Leu Trp Ala Gly Leu Arg Ala	
130 135 140	
acc ttg ccc ccc acc caa gaa gcc ctg ccc tcc agc cac agc agt cca	480
Thr Leu Pro Pro Thr Gln Glu Ala Leu Pro Ser Ser His Ser Ser Pro	
145 150 155 160	

cag cag cag ggt 492  
Gln Gln Gln Gly

<210> 33

<211> 495

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> mat peptide

<222> 1..495

<400> 33

aca tct gca cct cag aca act gcc act gtc tta act gga agc tca aaa 48  
Thr Ser Ala Pro Gln Thr Thr Ala Thr Val Leu Thr Gly Ser Ser Lys  
1 5 10 15

gac cca tgc tct tcc tgg tct cca gca gtc cca act aag cag tac cca 96  
Asp Pro Cys Ser Ser Trp Ser Pro Ala Val Pro Thr Lys Gln Tyr Pro  
20 25 30

gca ctg gat gtg att tgg cca gaa aaa gaa gtg cca ctg aat gga act 144  
Ala Leu Asp Val Ile Trp Pro Glu Lys Glu Val Pro Leu Asn Gly Thr  
35 40 45

ctg acc ttg tcc tgt act gcc tgc agc cgc ttc ccc tac ttc agc atc 192  
Leu Thr Leu Ser Cys Thr Ala Cys Ser Arg Phe Pro Tyr Phe Ser Ile  
50 55 60

ctc tac tgg ctg ggc aat ggt tcc ttc att gag cac ctt cca ggc cgg 240  
Leu Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu Pro Gly Arg  
65 70 75 80

ctg aag gag ggc cac aca agt cgc gag cac agg aac aca agc acc tgg 288  
Leu Lys Glu Gly His Thr Ser Arg Glu His Arg Asn Thr Ser Thr Trp

85	90	95	
ctg cac agg gcc ttg gtg ctg gaa gaa ctg agc ccc acc cta cga agt			336
Leu His Arg Ala Leu Val Leu Glu Glu Leu Ser Pro Thr Leu Arg Ser			
100	105	110	
acc aac ttc tcc tgt ttg ttt gtg gat cct gga caa gtg gcc cag tat			384
Thr Asn Phe Ser Cys Leu Phe Val Asp Pro Gly Gln Val Ala Gln Tyr			
115	120	125	
cac atc att ctg gcc cag ctc tgg gat ggg ttg aag aca gct ccg tcc			432
His Ile Ile Leu Ala Gln Leu Trp Asp Gly Leu Lys Thr Ala Pro Ser			
130	135	140	
cct tct caa gaa acc ctc tct agc cac agc cca gta tcc aga tca gca			480
Pro Ser Gln Glu Thr Leu Ser Ser His Ser Pro Val Ser Arg Ser Ala			
145	150	155	160
ggc cca ggg gtt gca			495
Gly Pro Gly Val Ala			
165			
<210> 34			
<211> 411			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 34			
aca cct gtc tcg cag acc acc aca gct gcc act gcc tca gtt aga agc			48
Thr Pro Val Ser Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser			
1	5	10	15
aca aag gac ccc tgc ccc tcc cag ccc cca gtg ttc cca gca gct aag			96
Thr Lys Asp Pro Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys			
20	25	30	

cag tgt cca gca ttg gaa gtg acc tgg cca gag gtg gaa gtg cca ctg 144  
 Gln Cys Pro Ala Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu  
           35                    40                    45

aat gga acg ctg agc tta tcc tgt gtg gcc tgc agc cgc ttc ccc aac 192  
 Asn Gly Thr Leu Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe Pro Asn  
           50                    55                    60

ttc agc atc ctc tac tgg ctg ggc aat ggt tcc ttc att gag cac ctc 240  
 Phe Ser Ile Leu Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu  
           65                    70                    75                    80

cca ggc cga ctg tgg gag ggg agc acc agc cgg gaa cgt ggg agc aca 288  
 Pro Gly Arg Leu Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser Thr  
                                 85                    90                    95

ggt acg cag ctg tgc aag gcc ttg gtg ctg gag cag ctg acc cct gcc 336  
 Gly Thr Gln Leu Cys Lys Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Thr Pro Ala  
                                 100                    105                    110

ctg cac agc acc aac ttc tcc tgt gtg ctc gtg gac cct gaa cag gtt 384  
 Leu His Ser Thr Asn Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val  
                                 115                    120                    125

gtc cag cgt cac gtc gtc ctg gcc cag 411  
 Val Gln Arg His Val Val Leu Ala Gln  
           130                    135

<210> 35

<211> 216

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

tgtgtgactg gagaagagga cgttgtcaca gataaagagc caggctcacc agctcctgac 60

gcatgcatc atg acc atg aga cac aac tgg aca cca gac ctc agc cct ttg 111  
 Met Thr Met Arg His Asn Trp Thr Pro Asp Leu Ser Pro Leu  
 1 5 10

tgg gtc ctg ctc ctg tgt gcc cac gtc gtc act ctc ctg gtc aga gcc 159  
 Trp Val Leu Leu Leu Cys Ala His Val Val Thr Leu Leu Val Arg Ala  
 15 20 25 30

aca cct gtc tcg cag acc acc aca gct gcc act gcc tca gtt aga agc 207  
 Thr Pro Val Ser Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser  
 35 40 45

aca aag gac 216  
 Thr Lys Asp

<210> 36

<211> 234

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 36

ttc tcc tgt gtg ctc gtg gac cct gaa cag gtt gtc cag cgt cac gtc 48  
 Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val Val Gln Arg His Val  
 1 5 10 15

gtc ctg gcc cag ctc tgg gctggg ctg agg gca acc ttg ccc ccc acc 96  
 Val Leu Ala Gln Leu Trp Ala Gly Leu Arg Ala Thr Leu Pro Pro Thr  
 20 25 30

caa gaa gcc ctg ccc tcc agc cac agc agt cca cag cag cag ggt 141  
 Gln Glu Ala Leu Pro Ser Ser His Ser Ser Pro Gln Gln Gln Gly  
 35 40 45

taagactcag cacagggcca gcagcagcac aaccttgacc agagcttggg tcctacctgt 201

ctacctggag tgaacagtcc ctgactgcct gta 234

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 744

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat peptide

&lt;222&gt; 160..651

&lt;400&gt; 37

tgtgtgactg gagaagagga cgtgtgcaca gataaagagc caggctcacc agctcctgac 60

gcatgcatc atg acc atg aga cac aac tgg aca cca gac ctc agc cct ttg 111

Met Thr Met Arg His Asn Trp Thr Pro Asp Leu Ser Pro Leu

-30

-25

-20

tgg gtc ctg ctc ctg tgt gcc cac gtc gtc act ctc ctg gtc aga gcc 159

Trp Val Leu Leu Leu Cys Ala His Val Val Thr Leu Leu Val Arg Ala

-15

-10

-5

aca cct gtc tcg cag acc acc aca gct gcc act gcc tca gtt aga agc 207

Thr Pro Val Ser Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser

1

5

10

15

aca aag gac ccc tgc ccc tcc cag ccc cca gtg ttc cca gca gct aag 255

Thr Lys Asp Pro Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys

20

25

30

cag tgt cca gca ttg gaa gtg acc tgg cca gag gtg gaa gtg cca ctg 303

Gln Cys Pro Ala Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu

35

40

45

aat gga acg ctg agc tta tcc tgt gtg gcc tgc agc cgc ttc ccc aac 351

Asn Gly Thr Leu Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe Pro Asn

50

55

60



ttc agc atc ctc tac tgg ctg ggc aat ggt tcc ttc att gag cac ctc 399  
 Phe Ser Ile Leu Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu  
 65 70 75 80

cca ggc cga ctg tgg gag ggg agc acc agc cgg gaa cgt ggg agc aca 447  
 Pro Gly Arg Leu Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser Thr  
 85 90 95

ggt acg cag ctg tgc aag gcc ttg gtg ctg gag cag ctg acc cct gcc 495  
 Gly Thr Gln Leu Cys Lys Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Thr Pro Ala  
 100 105 110

ctg cac agc acc aac ttc tcc tgt gtg ctc gtg gac cct gaa cag gtt 543  
 Leu His Ser Thr Asn Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val  
 115 120 125

gtc cag cgt cac gtc gtc ctg gcc cag ctc tgg gct ggg ctg agg gca 591  
 Val Gln Arg His Val Val Leu Ala Gln Leu Trp Ala Gly Leu Arg Ala  
 130 135 140

acc ttg ccc ccc acc caa gaa gcc ctg ccc tcc agc cac agc agt cca 639  
 Thr Leu Pro Pro Thr Gln Glu Ala Leu Pro Ser Ser His Ser Ser Pro  
 145 150 155 160

cag cag cag ggt taagactcag cacagggcca gcagcagcac aaccttgacc 691  
 Gln Gln Gln Gly

agagcttggg tcttacctgt ctacctggag tgaacagtcc ctgactgcct gta 744

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 351

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 38

gca gtc cca act aag cag tac cca gca ctg gat gtg att tgg cca gaa 48  
 Ala Val Pro Thr Lys Gln Tyr Pro Ala Leu Asp Val Ile Trp Pro Glu  
 1 5 10 15

aaa gaa gtg cca ctg aat gga act ctg acc ttg tcc tgt act gcc tgc 96  
 Lys Glu Val Pro Leu Asn Gly Thr Leu Thr Leu Ser Cys Thr Ala Cys  
 20 25 30

agc cgc ttc ccc tac ttc agc atc ctc tac tgg ctg ggc aat ggt tcc 144  
 Ser Arg Phe Pro Tyr Phe Ser Ile Leu Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser  
 35 40 45

ttc att gag cac ctt cca ggc cgg ctg aag gag ggc cac aca agt cgc 192  
 Phe Ile Glu His Leu Pro Gly Arg Leu Lys Glu Gly His Thr Ser Arg  
 50 55 60

gag cac agg aac aca agc acc tgg ctg cac agg gcc ttg gtg ctg gaa 240  
 Glu His Arg Asn Thr Ser Thr Trp Leu His Arg Ala Leu Val Leu Glu  
 65 70 75 80

gaa ctg agc ccc acc cta cga agt acc aac ttc tcc tgt ttg ttt gtg 288  
 Glu Leu Ser Pro Thr Leu Arg Ser Thr Asn Phe Ser Cys Leu Phe Val  
 85 90 95

gat cct gga caa gtg gcc cag tat cac atc att ctg gcc cag ctc tgg 336  
 Asp Pro Gly Gln Val Ala Gln Tyr His Ile Ile Leu Ala Gln Leu Trp  
 100 105 110

gat ggg ttg aag aca 351  
 Asp Gly Leu Lys Thr  
 115

<210> 39

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

&lt;400&gt; 39

ctgagcctta gagctccaag aagctattcg gggcttagga gccagaagct gactgctgcc 60

tgcccttccc agaaggaggc tggcaagctg gcaaacggac tggtgcttcc cagaggaagt 120

cacagacacc agacttgctt gcaagtcac atg acc atg aga cac tgc tgg aca 174

Met Thr Met Arg His Cys Trp Thr

1

5

gca ggc ccc agt tct tgg tgg gtc ctg ctt ttg tat gtc cat gtc att 222

Ala Gly Pro Ser Ser Trp Trp Val Leu Leu Leu Tyr Val His Val Ile

10

15

20

ttg gcc aga gcc aca tct gca cct cag aca act gcc act gtc tta act 270

Leu Ala Arg Ala Thr Ser Ala Pro Gln Thr Thr Ala Thr Val Leu Thr

25

30

35

40

gga agc tca aaa gac cca tgc tct tcc tgg tct cca gca gtc cca act 318

Gly Ser Ser Lys Asp Pro Cys Ser Ser Trp Ser Pro Ala Val Pro Thr

45

50

55

aag cag tac cca gca ctg 336

Lys Gln Tyr Pro Ala Leu

60

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 253

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 40

gat cct gga caa gtg gcc cag tat cac atc att ctg gcc cag ctc tgg 48

Asp Pro Gly Gln Val Ala Gln Tyr His Ile Ile Leu Ala Gln Leu Trp

1

5

10

15

gat ggg ttg aag aca gct ccg tcc cct tct caa gaa acc ctc tct agc 96  
 Asp Gly Leu Lys Thr Ala Pro Ser Pro Ser Gln Glu Thr Leu Ser Ser  
                   20                                  25                                  30

cac agc cca gta tcc aga tca gca ggc cca ggg gtt gca taaagccaac 145  
 His Ser Pro Val Ser Arg Ser Ala Gly Pro Gly Val Ala  
                   35                                  40                                  45

cacacatga ccttgaccag agcctggctc tcactctacct ggagggtgga gtctacacca 205

taggctgtga ttgcctttct gctgctgaac ctcaaaactca agcttcac 253

<210> 41

<211> 847

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> mat peptide

<222> 235..729

<400> 41

ctgagcctta gagctccaag aagctattcg gggcttagga gccagaagct gactgctgcc 60

tgcccttccc agaaggaggc tggcaagctg gcaaacggac tgttgcttcc cagaggaagt 120

cacagacacc agacttgctt gcaagtcac atg acc atg aga cac tgc tgg aca 174

Met Thr Met Arg His Cys Trp Thr

-25

gca ggc ccc agt tct tgg tgg gtc ctg ctt ttg tat gtc cat gtc att 222

Ala Gly Pro Ser Ser Trp Trp Val Leu Leu Leu Tyr Val His Val Ile

-20

-15

-10

-5

ttg gcc aga gcc aca tct gca cct cag aca act gcc act gtc tta act 270

Leu Ala Arg Ala Thr Ser Ala Pro Gln Thr Thr Ala Thr Val Leu Thr

1	5	10	
gga agc tca aaa gac cca tgc tct tcc tgg tct cca gca gtc cca act			318
Gly Ser Ser Lys Asp Pro Cys Ser Ser Trp Ser Pro Ala Val Pro Thr			
15	20	25	
aag cag tac cca gca ctg gat gtg att tgg cca gaa aaa gaa gtg cca			366
Lys Gln Tyr Pro Ala Leu Asp Val Ile Trp Pro Glu Lys Glu Val Pro			
30	35	40	
ctg aat gga act ctg acc ttg tcc tgt act gcc tgc agc cgc ttc ccc			414
Leu Asn Gly Thr Leu Thr Leu Ser Cys Thr Ala Cys Ser Arg Phe Pro			
45	50	55	60
tac ttc agc atc ctc tac tgg ctg ggc aat ggt tcc ttc att gag cac			462
Tyr Phe Ser Ile Leu Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His			
65	70	75	
ctt cca ggc cgg ctg aag gag ggc cac aca agt cgc gag cac agg aac			510
Leu Pro Gly Arg Leu Lys Glu Gly His Thr Ser Arg Glu His Arg Asn			
80	85	90	
aca agc acc tgg ctg cac agg gcc ttg gtg ctg gaa gaa ctg agc ccc			558
Thr Ser Thr Trp Leu His Arg Ala Leu Val Leu Glu Glu Leu Ser Pro			
95	100	105	
acc cta cga agt acc aac ttc tcc tgt ttg ttt gtg gat cct gga caa			606
Thr Leu Arg Ser Thr Asn Phe Ser Cys Leu Phe Val Asp Pro Gly Gln			
110	115	120	
gtg gcc cag tat cac atc att ctg gcc cag ctc tgg gat ggg ttg aag			654
Val Ala Gln Tyr His Ile Ile Leu Ala Gln Leu Trp Asp Gly Leu Lys			
125	130	135	140
aca gct ccg tcc cct tct caa gaa acc ctc tct agc cac agc cca gta			702
Thr Ala Pro Ser Pro Ser Gln Glu Thr Leu Ser Ser His Ser Pro Val			

145	150	155	
tcc aga tca gca ggc cca ggg gtt gca taaagccaac cacaccatga			749
Ser Arg Ser Ala Gly Pro Gly Val Ala			
160	165		
ccttgaccag agcctggctc tcattctacct ggagggtgga gtctacacca taggctgtga			809
ttgcctttct gctgctgaac ctcaaactca agcttcac			847

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP98/05186

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>6</sup> C07K14/54, C12P21/02, C12N15/24, A61K38/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>6</sup> C07K14/54, C12P21/02, C12N15/24, A61K38/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG),  
BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Mark D. Adams et al., "Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence", Nature (1995) Vol. 377, No. 6547 suppl. p.3-174	1-9
A	Ushio Shimpei et al, "Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in Escherichia coli, and studies on the biologic activities of the protein", Journal of Immunology (1996) Vol. 156, No. 11 p.4274-4279	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
17 February, 1999 (17. 02. 99)

Date of mailing of the international search report  
2 March, 1999 (02. 03. 99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C 07 K 14/54, C 12 P 21/02, C 12 N 15/24, A 61 K 38/20

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C 07 K 14/54, C 12 P 21/02, C 12 N 15/24, A 61 K 38/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Swiss Prot/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,  
WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Mark D.Adams et al. "Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence", Nature (1995) Vol.377, No.6547 suppl. p.3-174	1-9
A	Ushio Shimpei et al. "Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in Escherichia coli, and studies on the biologic activities of the protein", Journal of Immunology (1996) Vol.156, No.11 p.4274-4279	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.02.99

国際調査報告の発送日

02.03.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4 B

9637



電話番号 03-3581-1101 内線 3449